

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Medicina
Departamento de Cirugía

USO DE SUTURAS RECUBIERTAS DE CÉLULAS MADRE
(BIOSUTURAS)
EN ANASTOMOSIS CÓLICAS
ESTUDIO EXPERIMENTAL EN LA RATA

Isabel Pascual Migueláñez

2007

Don **DAMIÁN GARCÍA OLMO**, Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, Doña **GEMMA FERNÁNDEZ MIGUEL**, Doctora en Biología y Don **LUÍS GARCÍA-SANCHO MARTÍN**, Catedrático de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN

Que Doña ISABEL PASCUAL MIGUELÁÑEZ ha realizado bajo su dirección y tutela el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor en Enero de 2007 titulado **“USO DE SUTURAS RECUBIERTAS DE CÉLULAS MADRE (BIOSUTURAS) EN ANASTOMOSIS CÓLICAS. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN LA RATA”**, cumpliendo todos los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral. Una vez redactada la presente Memoria, ha sido revisada por los que suscriben, encontrándola apta para ser presentada y defendida ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste a los efectos oportunos firman el presente certificado en Madrid, 14 de Enero de 2007.

Prof. García Olmo

Dra. Fernández Miguel

Prof. García-Sancho Martín

A mi padre

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar agradeciendo a mis directores de tesis su apoyo y dedicación.

A Damián García Olmo le agradezco la confianza depositada en mí desde el día que me conoció, cuando llegué al servicio de Cirugía General de La Paz en Junio de 2003. Me ofreció este trabajo, el mejor regalo que podía hacerle a una residente de cirugía con poca experiencia quirúrgica pero con muchas ganas de trabajar. La realización de esta tesis, que él me brindó, ha supuesto poder tomar un camino paralelo al de la residencia. Un camino, el de la investigación, al que me ha abierto los ojos y que espero poder seguir recorriendo. Le agradezco su optimismo inagotable, su energía y su capacidad para hacerme creer que todo es posible.

A Gemma Fernández Miguel le agradezco que me haya guiado con tanta paciencia. La he admirado todos estos meses por su capacidad de esfuerzo y trabajo constante. Me ha enseñado a trabajar con rigurosidad pero con buen humor. Con ella he aprendido lo que es el método científico, porque ha sabido ponerse a mi altura: la de una persona ajena a la investigación básica. Le agradezco que me haya enseñado su forma de trabajar y todos los ratos que hemos compartido. Ha sido un verdadero placer conocerla, como científica y como persona, y compartir esta tesis con ella.

Al Profesor García Sancho le agradezco el tiempo e interés dedicado a la elaboración de esta tesis. Sus consejos a la hora de escribir han sido esenciales, aportando claridad al texto.

A todos los miembros del Servicio de Cirugía General C les agradezco el interés que han demostrado por mi trabajo. Muchas conversaciones “de pasillo” con ellos me han hecho caer en la cuenta de cosas por resolver o nuevas vías que desarrollar. Al Profesor Rodríguez Montes le agradezco su ayuda en mi formación científica y su

apoyo tanto en la realización de esta tesis como en otros estudios. A todos los residentes de Cirugía General les agradezco que me hayan dado ánimos e ideas. He compartido con ellos todo el proceso de confección de la tesis, desde el verano de 2004, cuando organizamos el primer experimento hasta hoy. En especial les agradezco a Rebeca y a Mario todas las tardes que se han quedado conmigo ayudándome a operar y a medir. ¡Ahora me toca a mí echaros una mano!

Quisiera agradecer a Carmina su amabilidad y generosidad al permitirme usar el animalario de la UAM. Siempre ha encontrado un hueco para nosotros, a cualquier hora, entendiendo nuestras prisas y complicados horarios. También a todo el personal del animalario, a David y a Miguel, su ayuda con el cuidado y la manipulación de las ratas. Le agradezco también a Dolores García Olmo el esfuerzo que ha realizado para coordinarse con nosotros y proporcionarnos los animales.

Al Dr. Cabrujas, al Dr. Canto y a Ester os agradezco la ayuda que me habéis prestado para realizar el análisis histológico de las anastomosis.

Gracias a Pilar Castillo por su generosidad al compartir conmigo su lugar y material de trabajo, y a todos los residentes del Servicio de Digestivo por su interés y por echarme una mano con el equipo de manometría cuando estaban de guardia.

A Elisa Villasevil y Belén, de la Unidad de Bioestadística, les agradezco su ayuda con la comparación de las muestras. Gracias por vuestra colaboración y vuestra disponibilidad.

Le agradezco a Alberto Touza toda la ayuda que me ha prestado este año con motivo de su beca de colaboración en el Servicio de Cirugía General.

A mis amigas Clara, Ana, Isabel y María os agradezco que estéis siempre ahí. Cuando una experiencia como esta pasa por el filtro de una de nuestras cenas toma un carácter diferente, cómico casi siempre, que hace que no vuelva a ser igual.

A mi familia os agradezco que siempre estéis a mi lado, ayudándome en todo lo que podéis. Me hace mucha ilusión que por fin llegue el resultado de todo esto que os he ido contando por capítulos.

David, a ti te agradezco que estés siempre, tu comprensión y tu confianza.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	9
1. Anastomosis del colon	La cicatrización de las anastomosis digestivas 9
	Dehiscencias anastomóticas en cirugía colorrectal 18
	Las adherencias peritoneales 26
2. Terapia celular	Definición de célula madre 35
	Células madre y cicatrización 38
	Terapia celular 39
3. Hipótesis de trabajo	45
OBJETIVOS	46
MATERIAL Y MÉTODO	47
1. Animales	47
2. Material	Material anestésico 48
	Material quirúrgico 48
	Material de medida de las variables 49
3. Métodos	Método de obtención de células madre de tejido adiposo 49
	Método de carga celular de las suturas 55
	Método anestésico para la cirugía 59
	Método quirúrgico 59
	Medida de las variables 63
4. Diseño experimental	69
5. Método estadístico	72

RESULTADOS	73
Anastomosis cólicas estándar	Grupo 4º día postanastomosis 73
	Grupo 7º día postanastomosis 78
	Grupo 14º día postanastomosis 82
	Grupo 21º día postanastomosis 86
Anastomosis cólicas críticas	Modelo 1: lámina de látex 92
	Modelo 2: icodextrina 4% 96
 DISCUSIÓN	 109
El hilo de sutura con células madre	111
Disminución de las adherencias peritoneales	113
La medida de la resistencia de las anastomosis	117
El patrón gráfico de ruptura de las anastomosis	118
La evolución de las anastomosis en el estudio histológico	119
Modelo de anastomosis críticas	122
Anastomosis críticas y biosuturas	123
 RESUMEN	 126
 CONCLUSIONES	 135
 BIBLIOGRAFÍA	 136

INTRODUCCIÓN

1. Anastomosis del colon

La cicatrización de las anastomosis digestivas

En la cirugía digestiva es muy frecuente la sección y exéresis de una parte del tubo digestivo por diversas causas (tumores, isquémicas, inflamatorias...) con la consiguiente necesidad de restablecer su continuidad mediante la práctica de una anastomosis entre los dos cabos libres de enfermedad. En cirugía colorrectal una correcta técnica tiene como objetivo la aproximación de los bordes del colon sin tensión y con una buena vascularización¹, pero lo más influyente en la restauración de la continuidad del tejido son los mecanismos de inflamación y cicatrización que se ponen en marcha tras la agresión quirúrgica.

La dehiscencia de una anastomosis cólica suele ser un problema clínico de primer orden, ya que puede provocar una peritonitis por paso de materia fecal a la cavidad peritoneal que pone en riesgo la vida del enfermo y hace que sea necesaria una nueva operación. En esta segunda intervención la calidad de vida del paciente empeora al ser frecuente la necesidad de derivar el tránsito digestivo y realizar una colostomía.

Aunque para la mayoría de los autores dehiscencia (*dehiscence*) y fuga (*leak*) anastomótica son términos sinónimos, algunos hacen distinción entre ambos². Dehiscencia (del latín *dehiscens*, *-entis*, dehisciente) corresponde a “la apertura natural o espontánea de un órgano”³, es decir, es la solución de continuidad que puede aparecer en la anastomosis. Fuga (del latín *fuga*) es la “salida de gas o líquido por un orificio o por una abertura producidos accidentalmente”³. Por lo tanto, podríamos encontrarnos ante una dehiscencia sin fuga, por ejemplo, en una anastomosis rectal baja con ileostomía de protección. Esta última permitiría que una dehiscencia en la sutura rectal no tuviera fuga al estar el tránsito digestivo derivado a la piel en un punto proximal a la

anastomosis. Aunque formalmente los dos términos son diferentes, tanto en la práctica clínica como en la literatura médica, se usan como sinónimos.

Las anastomosis colorrectales tienen un período crítico de aparición de dehiscencias y fugas anastomóticas entre el tercer y el quinto día, que coincide con la fase de menos resistencia de la sutura ^{4,5}. En estos días existe una disminución en la cantidad de colágeno de la submucosa cólica y una pobre respuesta vascular, y éstas parecen ser las causas de la menor fuerza anastomótica ⁶.

El tubo digestivo está compuesto por cuatro capas (con excepción de los segmentos extraperitoneales: esófago y tercio inferior del recto): mucosa, submucosa, muscular y serosa ⁷ (Figura 1).

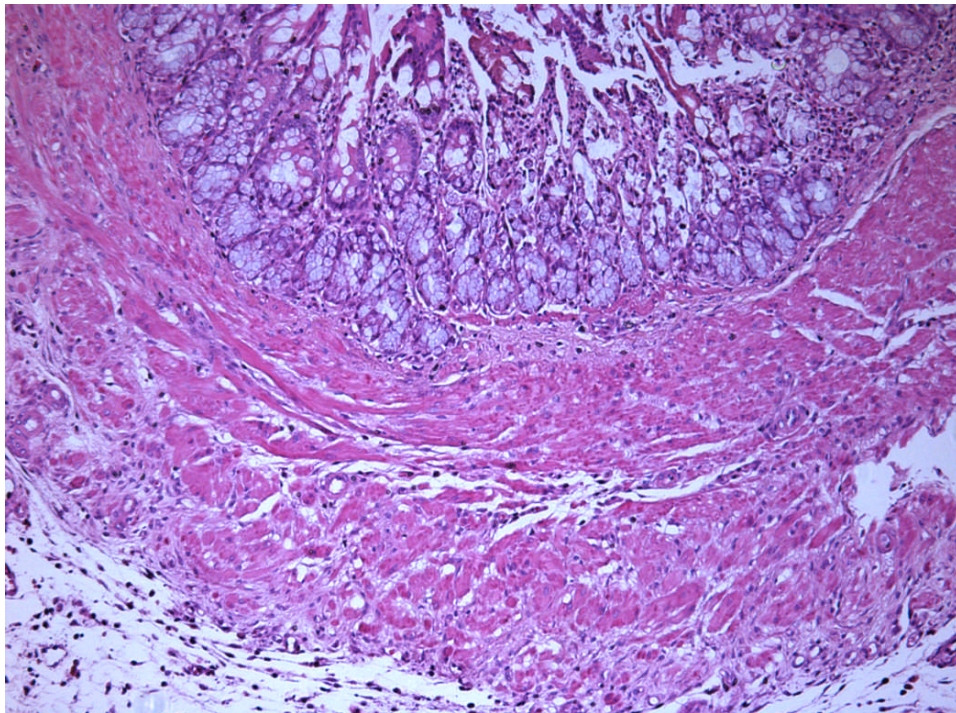


Figura 1. Capas del tubo digestivo: mucosa, submucosa, muscular y serosa. (Hematoxilina - eosina 10 x).

La **mucosa** de las anastomosis gastrointestinales se repara por migración e hiperplasia de las células epiteliales. La aposición directa de los tejidos permite completar este proceso en tres días. Tanto la inversión como la eversión de la mucosa intestinal retrasan dicho proceso¹⁰.

La **submucosa** es la capa que proporciona a las vías gastrointestinales intactas gran parte de su resistencia, y la capa del tubo digestivo que retiene los puntos de sutura que permiten la unión de los dos cabos intestinales de una anastomosis. Está formada por una red de fibras de colágeno y fibras elásticas entrelazadas. Se compone de un 68% de colágeno tipo I, un 20% de colágeno tipo II y un 12% de colágeno tipo V. Las fibras forman una red dispuestas en ángulo de 50 grados con el eje longitudinal del intestino cuando éste permanece en reposo. Si el diámetro intestinal aumenta, las fibras cambian su angulación a 60 grados, y si aumenta la tensión longitudinal, la angulación de las fibras disminuye a 30 grados. Se trata, por lo tanto, de una red flexible, encargada de dotar a la pared del intestino de resistencia. Los fibroblastos, y probablemente también en algunas ocasiones las células musculares lisas, sintetizan las fibras de colágeno de la red^{8,9}.

La **muscular** está formada por dos capas: una externa longitudinal y otra interna circular. Su contracción sincronizada permite la propulsión distal del alimento, movimiento conocido como peristalsis. Si existe tensión en una anastomosis digestiva este movimiento la empeora y favorece las dehiscencias.

La **serosa** protege las anastomosis de dehiscencias y fugas anastomóticas. Está compuesta por una delgada capa de tejido conectivo recubierta de las células mesoteliales del peritoneo¹¹. La aposición de esta capa mediante una sutura invertida minimiza el riesgo de dehiscencia. Los segmentos del tubo digestivo extraperitoneales

(esófago y tercio inferior de recto), que no poseen serosa, tienen mayor índice de complicaciones ^{12, 13}.

La inflamación y reparación de los tejidos son la respuesta del organismo a la lesión. Estos dos procesos se encuentran interrelacionados y son característicos de los seres vivos superiores, que poseen árbol vascular. Su objetivo es establecer puentes tisulares entre los extremos del tejido agredido mediante la formación de tejido conjuntivo (cicatrización) o regenerando las células parenquimatosas primitivas (regeneración). Ambos procesos son imprescindibles en el ser humano, aunque en exceso resultan nocivos ¹⁴. Al realizar una incisión en la pared intestinal se ponen en marcha los fenómenos de inflamación y cicatrización.

La cicatrización se divide en tres fases que se superponen en el tiempo: 1) hemostasia e inflamación, 2) proliferación y 3) maduración o remodelación. Aunque básicamente los fenómenos acontecidos en cada fase son los mismos en todos los tejidos, existen algunas diferencias entre la cicatrización del tejido intestinal y la piel, que ha sido el modelo de cicatrización más utilizado. En primer lugar, existen diferencias en cuanto a la duración de cada fase: el tiempo en que una anastomosis digestiva alcanza su resistencia definitiva es menor que el tiempo en el que una herida en la piel llega a su mayor resistencia a la dehiscencia. Es más, dentro del mismo tubo digestivo también existen diferencias y, por ejemplo, el estómago cicatriza antes que el colon ¹⁵ (Figura 2). El tiempo en que una anastomosis de intestino delgado llega a la resistencia previa es de cuatro semanas; el tiempo en que una anastomosis de colon llega al 75% de la resistencia previa es de cuatro meses ⁷.

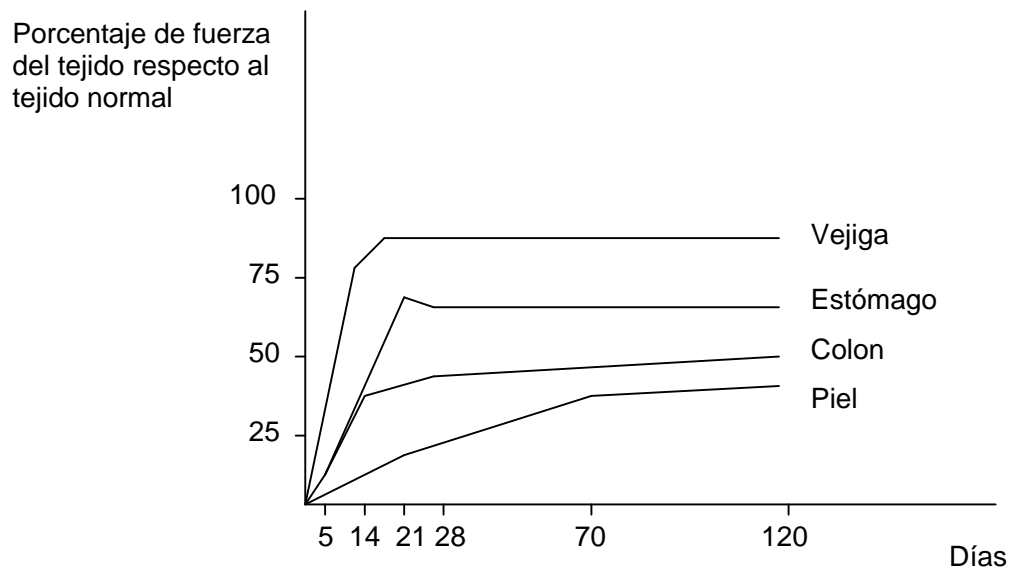


Figura 2. Comparación de la resistencia de las heridas en diferentes tejidos.⁷

La piel y el tubo digestivo también se diferencian en la producción de colágeno, regulada de forma diferente en cada tejido¹⁶, y en la participación del músculo liso en las anastomosis digestivas¹⁷.

La cicatrización intestinal comienza con una intensa vasoconstricción inicial hemostática seguida de una vasodilatación secundaria y un aumento en la permeabilidad vascular, lo que permite la exudación de proteínas plasmáticas y la formación de un coágulo de fibrina que une los bordes de la anastomosis (Figura 3).

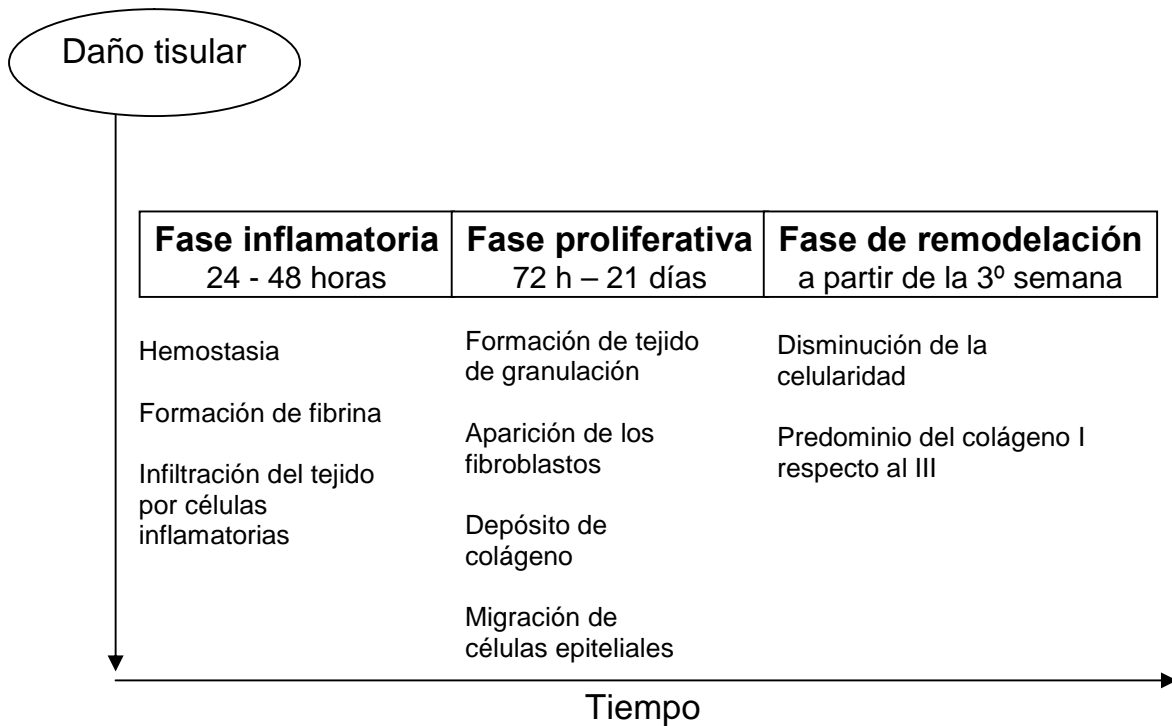


Figura 3. Las tres fases de la cicatrización de las heridas: inflamatoria, proliferativa y de remodelación.

Durante las primeras 24 horas predomina la extravasación de leucocitos polimorfonucleares hacia el tejido lesionado (Figura 4) y posteriormente, a las 24-48 horas, los monocitos y los macrófagos titulares los van sustituyendo. Estos procesos conforman la primera fase de la cicatrización (fase de hemostasia e inflamación)¹⁸.

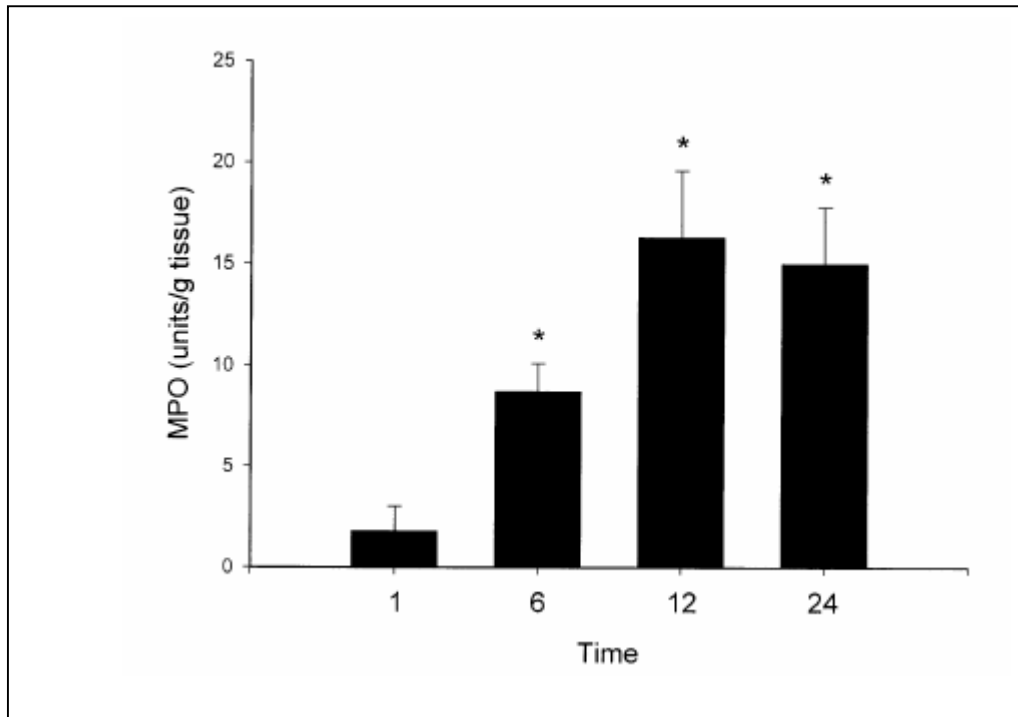


Figura 4. La enzima mieloperoxidasa es una enzima muy abundante en los neutrófilos y se considera un marcador de los acúmulos de estas células en el intestino in vivo. Los niveles de actividad de mieloperoxidasa medidos por espectrofotometría reflejan en esta gráfica la llegada a una anastomosis cólica de los neutrófilos, desde la primera hora a las 24 horas postoperatorias. MPO: mieloperoxidasa.

Extraído de: Mansson P, Zhang XW, Jeppsson B, Thorlacius H. Anastomotic healing in the rat colon: comparison between a radiological method, breaking strength and bursting pressure. *Int J Colorectal Dis* 2002; 17: 420-425 ¹⁹.

A continuación comienza la fase de proliferación, que se caracteriza por la formación de tejido de granulación (a partir de las 48 horas aparecen incipientes capilares en los bordes de la anastomosis, aunque la vascularización todavía es pobre) y la llegada de fibroblastos. La llegada de los fibroblastos está regulada por varios factores de crecimiento: el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante beta ($TGF\beta$) y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF). Los fibroblastos se convierten en la célula mayoritaria al cuarto

día, aunque a partir de las 72 horas ya producen colágeno, proceso que continúa durante varias semanas. Su síntesis requiere la hidroxilación de los aminoácidos lisina y prolina mediante la participación de cofactores como el hierro, el oxígeno molecular, la vitamina C y el alfa-cetoglutarato. Durante la fase proliferativa existe un equilibrio entre la producción y la lisis de colágeno ^{20, 21}. En el período crítico de aparición de dehiscencias (entre el tercer y el quinto día postoperatorio) la producción de colágeno ya se ha iniciado, pero hay una importante actividad colagenolítica que impide que la cantidad de colágeno presente otorgue resistencia suficiente a la anastomosis. Esta actividad colagenolítica parece deberse a la liberación por parte de neutrófilos y macrófagos de mediadores proinflamatorios y metaloproteinasas con capacidad para lisar el colágeno recién sintetizado ^{22, 23, 24}. En esta fase encontramos otra diferencia con la cicatrización dérmica: la formación del tejido de granulación puede mejorarse por la participación del epiplon en las anastomosis digestivas intraperitoneales cuando éste se coloca alrededor de la línea de sutura ^{25, 26}.

En la fase de remodelación el tejido de granulación recién formado cambia, disminuyendo el número de macrófagos y fibroblastos y aumentando la cantidad de colágeno. También la proporción de fibras de colágeno varía, incrementándose las fibras de tipo I respecto a las de tipo III.

Hay numerosos factores que influyen en la cicatrización digestiva. Uno de los más importantes es la perfusión tisular. Los tejidos isquémicos no cicatrizan bien, y esta situación puede darse si se altera la anatomía vascular, el control vasomotor o existe una pobre presión arterial de oxígeno (pO_2). La perfusión local se ve influida por dos factores: la preservación de los vasos que irrigan los dos extremos del tubo digestivo que se van a anastomosar, y la tensión en la línea de la anastomosis. Este último factor resulta clave en las anastomosis cólicas. La formación de colágeno se ve alterada si la

pO₂ cae por debajo de 40 mm Hg, y por debajo de 10 mm Hg la anastomosis fracasa debido a disfunción en la angiogénesis y la epitelización ^{27, 28}.

Otros factores asociados a mala cicatrización intestinal se describen en la tabla 1.

Locales	Sistémicos
Hipoperfusión tisular	Malnutrición
Tensión anastomótica	Transfusión sanguínea
Pobre aposición de bordes	Hipovolemia/shock
Infección local	Medicación (cisplatino...)
Radiación	Inmunodepresión
Obstrucción distal	Diabetes mal controlada
	Ictericia

Tabla 1. Factores que influyen en la cicatrización gastrointestinal.

Modificada de: Thompson SK, Chang EY, Jobe BA. Clinical review: Healing in gastrointestinal anastomoses, part I. Microsurgery 2006; 26: 131-136 ²⁹.

Como ya se ha comentado, la formación de colágeno requiere la participación de las vitaminas A, C y B₆, pero también se necesitan minerales como el cobre y el zinc para la síntesis. El hierro y el zinc participan como cofactores en los procesos de formación de ADN. Estas son algunas de las razones por las cuales los pacientes malnutridos están predispuestos a fallos de cicatrización.

La infección de las heridas quirúrgicas retrasa su cicatrización. Un aumento en la respuesta inflamatoria por esta causa conlleva una mayor actividad de lisis de colágeno por un incremento en las proteasas titulares³⁰.

Dehiscencias anastomóticas en cirugía colorrectal

La curva clásica de cicatrización del tubo digestivo tiene una trayectoria sigmoidea a lo largo del tiempo (Figura 5). Comienza con una fase de latencia en la que la presión de ruptura permanece estable y pronto comienza a decrecer, llegando un periodo de alto riesgo de dehiscencias. En cirugía de colon y recto esta fase crítica comprende del tercer al quinto día postoperatorio. A partir de este momento la síntesis de nuevo colágeno supera la colagenolisis y la curva de cicatrización vuelve a ascender, aumenta la fuerza de la anastomosis y desaparece el riesgo de dehiscencia y fuga.

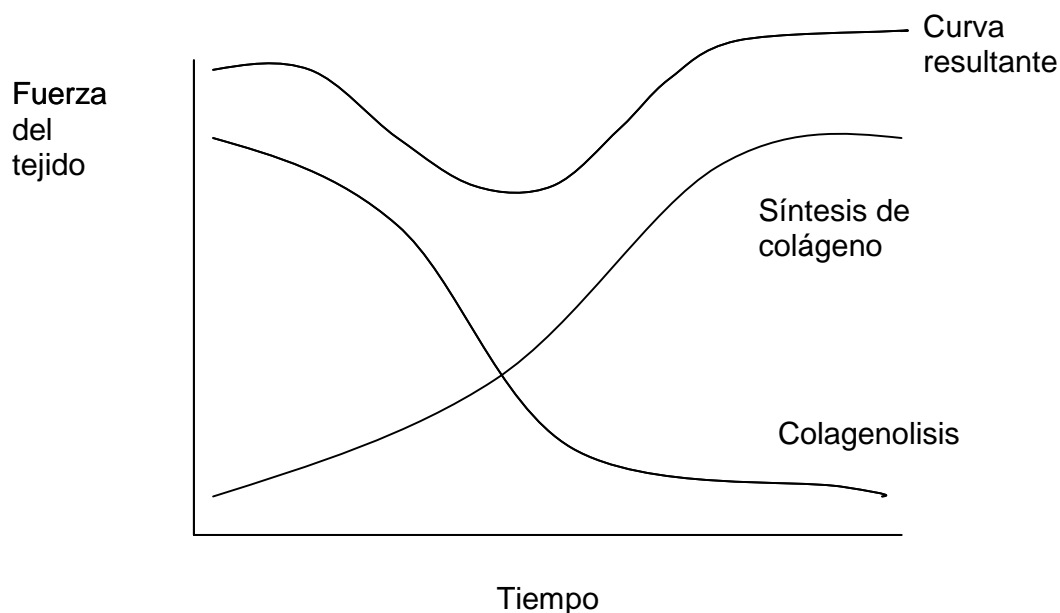


Figura 5. Curva de cicatrización.

La incidencia de dehiscencias en cirugía colorrectal oscila entre el 1 y el 39%, dependiendo del tipo de cirugía que se considere (cólica o rectal) y de cómo se mida la presencia de la dehiscencia. En general, las tasas más altas de dehiscencia aparecen en las anastomosis más bajas del tracto digestivo (recto) en series en las que se realiza una prueba de imagen de forma rutinaria para su detección ³¹.

El método diagnóstico de las dehiscencias y fugas anastomóticas es variable. Hay estudios en los que se lleva a cabo una prueba de imagen con contraste hidrosoluble, ya sea de forma rutinaria o en los casos de sospecha de dehiscencia, y otros en los que la clínica es suficientemente expresiva para su confirmación: signos de peritonitis, salida de líquido fecaloideo por la herida quirúrgica o por el drenaje, aparición de abscesos perianastomóticos, exudado purulento por la herida quirúrgica o por el drenaje, o presencia de fiebre. En otros estudios se requiere la reoperación del enfermo para hacer el diagnóstico. Las dehiscencias de anastomosis colo-cólicas varían según las series entre el 2% y el 7%. Si se incluye la cirugía rectal y si se usa de rutina una prueba de imagen con contraste entre el día 7 y el día 10 del postoperatorio, el número de dehiscencias se incrementa hasta un 39%. Clínicamente, sin embargo, la incidencia de dehiscencias en cirugía colorrectal se sitúa entre el 1% y el 17% ³¹.

En la cirugía del cáncer de recto la incidencia de dehiscencias tras resección anterior baja se encuentra alrededor del 10% ^{32, 33}. En la serie de 1958 pacientes del “Grupo Noruego de cáncer de recto”, una de las más numerosas en la literatura, se situó en 11,6% ³⁴. La aparición de una dehiscencia se asoció en esos pacientes a una mortalidad más elevada a los 30 días (7% frente a 4%), aunque no afectó de forma estadísticamente significativa a la incidencia de recidiva local posterior. Los factores asociados a dehiscencia en esta misma serie fueron: ser varón [OR 1,6 (1,1-2,2)], haber recibido radioterapia preoperatoria [OR 2,2 (1,0-4,7)], resección baja, 4-6 cm de

margen anal, [OR 3,5 (1,6-7,7)] o ultrabaja, a 3 cm o menos de margen anal, [OR 5,4 (2,3-12,9)]. La presencia de un estoma de protección redujo el riesgo de dehiscencia en un 60% en las anastomosis a menos de 6 cm de margen anal. La incidencia de dehiscencia anastomótica (8,1 – 12 %) y las variables asociadas a la misma (ser varón, tumores a menos de 5 cm del margen anal y no presencia de estoma de protección) se han confirmado en otras series ^{32, 33, 35, 36, 37, 38, 39}.

La mortalidad asociada a una dehiscencia y fuga anastomótica es mayor en las partes extraperitoneales (esófago y recto) del tubo digestivo, ya que la presencia de la serosa y del epiplon mayor permiten impermeabilizar la zona perianastomótica y que la peritonitis secundaria no se extienda a toda la cavidad abdominal. Como hemos comentado, en una correcta técnica quirúrgica digestiva se considera crucial una buena vascularización de los cabos anastomóticos. Una irrigación sanguínea deficiente puede conducir, por hipoperfusión submucosa, a una fibrosis y estenosis de la anastomosis. Si la vascularización es más precaria aún, los procesos de cicatrización serán insuficientes y se producirá una dehiscencia. La unión rectocólica y el esófago tienen una peor irrigación sanguínea que otras zonas del tubo digestivo. Por esta razón y por ser extraperitoneales las anastomosis esofágicas y rectales se consideran anastomosis de alto riesgo, tanto por su elevada proporción de dehiscencias como por las consecuencias de las mismas ⁴⁰.

La técnica de las anastomosis digestivas mecánicas se desarrolló gracias a los trabajos de Hült, Von Petz y Friedrich a comienzos del siglo XX ^{41, 42, 43}. Cuando se comparan las anastomosis mecánicas con aquellas realizadas manualmente en cirugía colorrectal (sin tener en cuenta el tipo de anastomosis: ileocólica, colocólica, colorrectal o ileorrectal) globalmente no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre ambas. En el meta-análisis realizado por MacRae y McLeod en 1998 ⁴⁴, en el que

se revisaron trece ensayos clínicos que comparaban ambas técnicas en colon y recto conjuntamente, la conclusión más importante a la que llegaron fue que las dos técnicas son igual de efectivas y que la decisión de utilizar una u otra puede basarse en la decisión personal del cirujano. Este estudio incluyó series de pacientes desde el año 1976, cuando los cirujanos tenían todavía poca experiencia en grapadoras digestivas, por lo que en las series iniciales ésta pudo ser la razón por la que se encontraron diferencias estadísticamente significativas en mayor frecuencia de aparición de problemas técnicos intraoperatorios cuando se usaron grapadoras en las anastomosis colorrectales ($p < 0,001$). También hubo diferencias estadísticamente significativas en la aparición de estenosis postoperatorias con grapadoras ($p = 0,015$ en todas las anastomosis y $p = 0,028$ en las anastomosis colorrectales), pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos técnicas en mortalidad, dehiscencia clínica o radiológica o recidiva tumoral local.

En una revisión sistemática más actual de nueve ensayos clínicos aleatorizados^{45, 46} en los que se comparan las anastomosis colorrectales realizadas con grapadoras intestinales frente a las anastomosis hechas con sutura manual sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la aparición de estenosis, que fue más frecuente en el grupo de las grapadoras intestinales ($p < 0,05$), y en el tiempo de realización de la anastomosis, más largo cuando la sutura era manual ($p < 0,05$). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la aparición de dehiscencias entre las dos técnicas [OR 0,80 (0,51-1,24)]. Analizando los ensayos clínicos incluidos en los que se pueden separar las anastomosis colorrectales por debajo del repliegue peritoneal (infraperitoneales) de las realizadas por encima (supraperitoneales) tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas en aparición de dehiscencias entre las dos técnicas (Tabla 2).

Estudio, año	Mecánica (n/N)	Manual (n/N)	OR (IC 95%)
ANASTOMOSIS INFRAPERITONEAL			
Elhadad, 1990	5/59	11/54	0,38 (0,13, 1,09)
Fingerhut, 1994	2/54	5/59	0,44 (0,10, 2,04)
Mcginn, 1985	7/58	2/60	3,42 (0,36, 1,55)
Total	14/171	18/173	0,74 (0,36, 1,55)
ANASTOMOSIS SUPRAPERITONEAL			
Beart, 1991	1/35	1/35	1,00 (0,06, 16,32)
Elhadad, 1990	6/74	5/85	1,41 (0,41, 4,80)
Fingerhut, 1995	0/85	0/74	No estimación
Sarker, 1994	0/30	2/30	0,13 (0,01, 2,14)
Total	7/224	8/224	0,97 (0,34, 2,74)

Tabla 2. Tabla comparativa de la incidencia de dehiscencias según la técnica de sutura y la altura de la anastomosis ⁴⁶.

N: número total de pacientes operados, n: pacientes que presentaron dehiscencia anastomótica, OR: *odds ratio*.

El riesgo de dehiscencia de las anastomosis manuales monoplaneo frente a las biplaneo es similar. Aunque la primera anastomosis intestinal invaginante fue descrita por el cirujano alemán P.F. Ramdohr en Wolfenbuttel en 1727 ⁴⁷, suele considerarse que las anastomosis digestivas tienen su origen en el siglo XIX con las descripciones de Lembert y Travers ^{48, 49} de la aproximación sero-serosa. Esta técnica de anastomosar en monoplaneo cualquier tramo del tubo digestivo fue posteriormente defendida por la escuela francesa de cirugía de mediados del siglo XX.

En 1836 Dieffenbach realizó la primera anastomosis de intestino delgado con éxito, según la técnica de Lembert. (Figura 6).

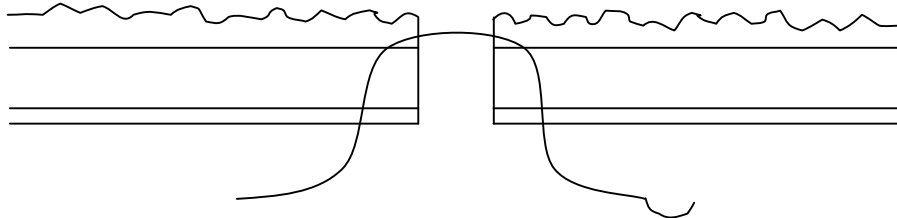


Figura 6. Esquema de la técnica de Lembert para anastomosis monoplaneo con puntos sueltos.

Con el paso de los años se describieron otros tipos de anastomosis monoplaneo también con puntos sueltos pero con alguna variación técnica ^{50, 51, 52}. (Figura 7).

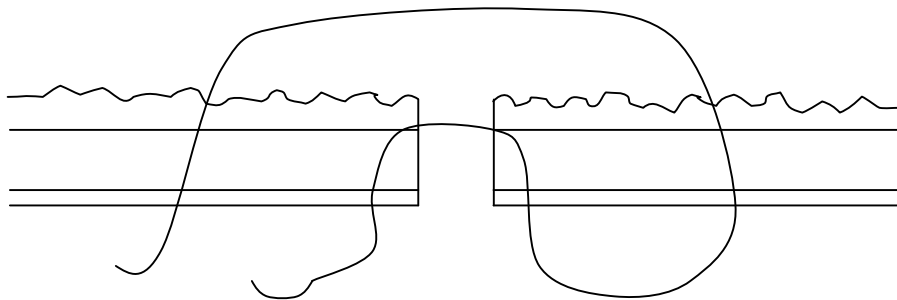


Figura 7. Esquema de anastomosis monoplaneo con puntos sueltos descritos por Gambee.

Hasta 1976 no se popularizó la anastomosis monoplane continua, descrita por Hautefeuille⁵³ y defendida por Buch posteriormente⁵⁴ (Figura 8).

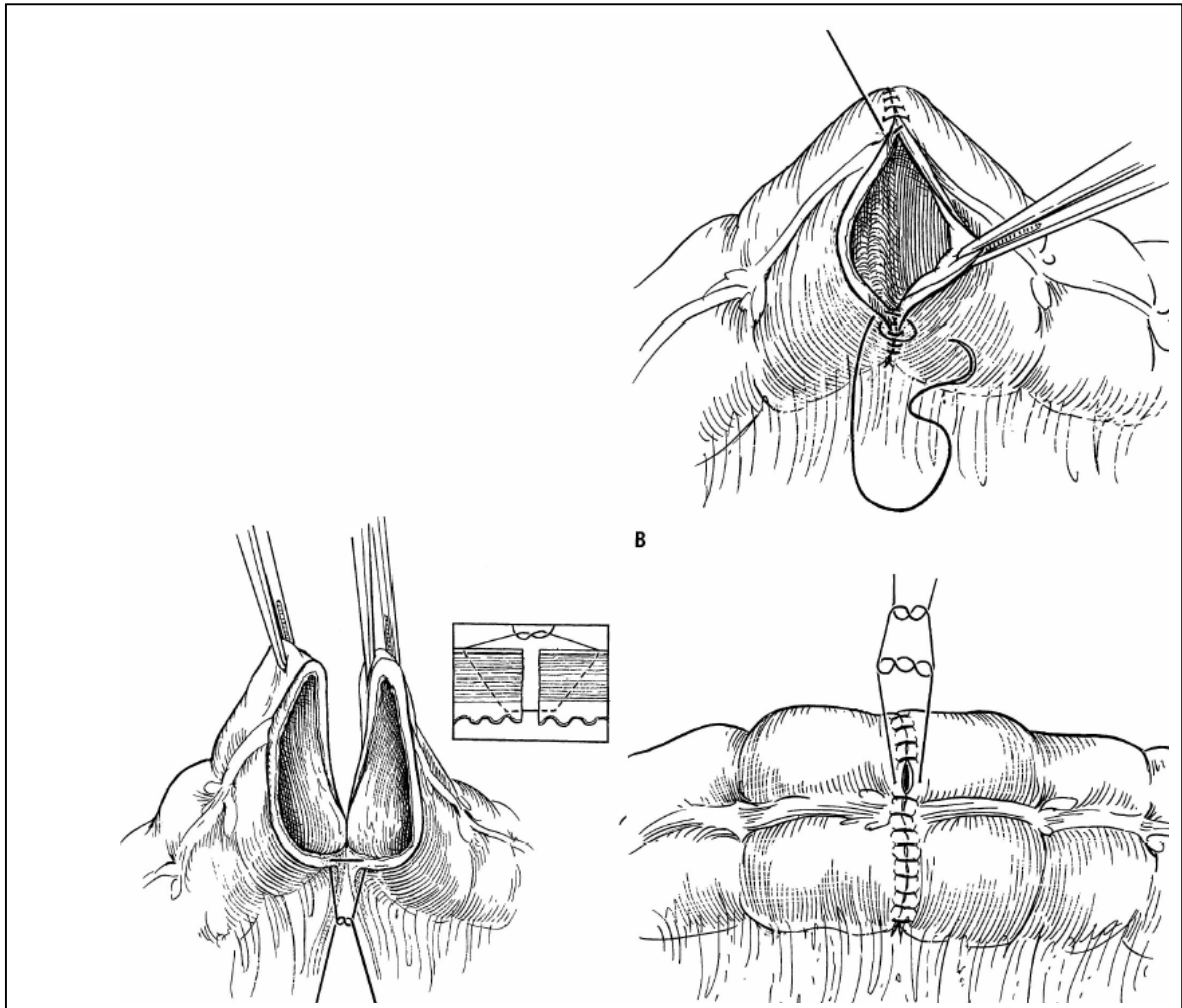


Figura 8. Anastomosis monoplane con sutura continua de material reabsorbible.

Extraído de: Buch JM. Injury to the colon and rectum. En: Mattox KL, Moore EE editores. Trauma. Nueva York: Mc Graw-Hill; 2000⁵⁴.

En 1880 Czerny preconizó la idea de que la aposición perfecta de la mucosa mediante una capa interna podría reducir el riesgo de dehiscencia anastomótica. La anastomosis biplano ha sido la más utilizada y defendida por la escuela germana por su

mayor impermeabilidad y solidez ⁵⁵; sin embargo, es denostada por otros grupos al producir una anastomosis invertida, con angulación de los vasos de hasta 90°, lo que propicia, teóricamente, la isquemia y posterior dehiscencia de la anastomosis.

En el reciente meta-análisis publicado por S. Shikata y cols. en el que se comparan las anastomosis monoplaneo con las biplaneo en cualquier tramo de intestino delgado o colon no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre ambas técnicas en cuanto a aparición de fístulas ⁵⁶ (Figura 9). Otros estudios que confirman, con menor número de pacientes, estos resultados abogan por la anastomosis monoplaneo con sutura reabsorbible frente a la sutura biplaneo al resultar más rápida y barata ^{57, 58, 59, 60, 61, 62}.

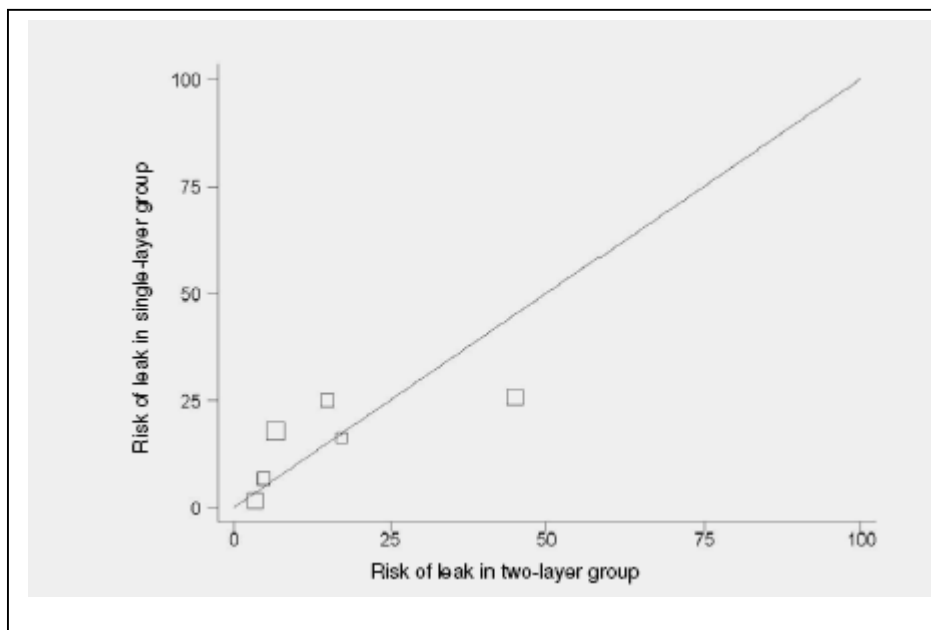


Figura 9. Riesgo de dehiscencia en anastomosis manuales monoplaneo vs biplaneo.

Extraído de: Shikata S, Yamagishi H, Taji Y, Shimada T, Noguchi Y. Single versus two- layer intestinal anastomosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. BMC Surg 2006; 6: 2-2 ⁵⁶.

En el momento actual la decisión de practicar una anastomosis látero-lateral, término-terminal, látero-terminal o término-lateral se basa en las preferencias del cirujano y las condiciones del enfermo, más que en recomendaciones absolutas, ya que no hay resultados claramente favorecedores de una de ellas ^{60, 63}. En general, las anastomosis término-terminales pueden realizarse cuando los dos cabos de intestino tienen un diámetro parecido, por lo que son frecuentes en las reconstrucciones colorrectales, y las anastomosis látero-terminales o término-laterales en casos de disparidad de calibre, como ocurre en las anastomosis ileocólicas o ileorrectales. Las anastomosis látero-laterales son las más frecuentes cuando se usan grapadoras intestinales lineales. Las últimas evidencias disponibles sí que parecen encontrar una ligera ventaja en anastomosis del tipo látero-laterales mecánicas en pacientes con enfermedad de Crohn en términos de dehiscencia y recidiva anastomótica^{64, 65}.

Las adherencias peritoneales

En los cinco primeros días que siguen a la cirugía del colon hay dos fenómenos biológicos dependientes de la inflamación que van a determinar su resultado: la aparición de dehiscencias y la formación de adherencias peritoneales.

Como consecuencia de la agresión quirúrgica sobre el peritoneo, se produce hemorragia y liberación de proteínas plasmáticas, que conducen al depósito de puentes de fibrina entre las superficies lesionadas. El daño peritoneal también provoca isquemia local y la respuesta inflamatoria hace que acudan a este foco leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y fibroblastos y que se formen nuevos vasos sanguíneos. Si los puentes de fibrina no son degradados en esta fase precoz, darán lugar a estructuras de tejido conectivo de mayor resistencia por la invasión de los fibroblastos ⁶⁶. Los fibroblastos forman parte del grupo de células que intervienen en la

cicatrización, como se ha comentado anteriormente ⁶⁷, y producen componentes de la matriz extracelular, como el colágeno, que sustituyen la fibrina y confieren firmeza a las adherencias. A partir de este momento se considera que la adherencia es irreversible.

La degradación de la fibrina en los primeros días del postoperatorio depende del plasminógeno, una proteína que en la cavidad peritoneal es sintetizada por las células mesoteliales. El plasminógeno participa en la fibrinólisis mediante su conversión a plasmina, una enzima proteolítica que digiere la fibrina, el fibrinógeno, y diversos factores que intervienen en la cascada de la coagulación (el factor V, el factor VII, la protrombina y el factor XII). El principal potenciador del paso del plasminógeno a plasmina es el activador tisular del plasminógeno (tPA), presente en células mesoteliales y endoteliales y cuya actividad está regulada, a su vez, por los inhibidores de la actividad del plasminógeno (PAIs), entre los que predomina el tipo 1 (PAI-1)⁶⁸. En presencia de una actividad fibrinolítica normal la matriz de fibrina es degradada, las células mesoteliales recubren el defecto peritoneal y el peritoneo se repara sin la formación de adherencias. En procesos en los que se daña el peritoneo (durante la cirugía abdominal y en situaciones de peritonitis) la actividad fibrinolítica está disminuida debido a la disminución en la secrección local de tPA ⁶⁹ y al incremento de los inhibidores de la actividad del plasminógeno PAI-1 and PAI-2 ⁷⁰. Por esta razón, al no degradarse la fibrina, se forman las adherencias ⁷¹. En condiciones de infección éstas constituyen un asiento de bacterias y pueden dar origen a abscesos ⁷².

Los fibroblastos que forman el colágeno, el cual sustituye a la fibrina y confiere firmeza a las adherencias, son diferentes de los fibroblastos aislados del peritoneo normal. Sus niveles de ARN mensajero de colágeno tipo I (un componente mayoritario de las adherencias) están muy elevados y aumentan incluso más con la hipoxia ⁷³. Este factor, la hipoxia, es para algunos autores determinante en la aparición de adherencias

peritoneales, ya que promueve la respuesta inflamatoria que precede a la fibrosis ⁷⁴. También se han encontrado diferencias entre los dos tipos de fibroblastos en la expresión citoplásmica de la *α actina de células musculares lisas* (αSMCA), mayor en los fibroblastos de las adherencias que en los de peritoneo normal. Este tipo de fibroblastos que expresan αSMCA se han encontrado en fibrosis de otros tejidos, como piel, pulmones, riñón y corazón ⁷⁵. Además se diferencian en que expresan una menor cantidad de tPA y una mayor cantidad de PAI-I, consiguiendo por ambas vías disminuir la actividad fibrinolítica ⁷⁶, y en que también expresan la enzima COX-2 ⁷⁷.

Las adherencias locales, alrededor de la línea anastomótica, aumentan la resistencia de las anastomosis al cuarto día postoperatorio ⁷⁸, pero a largo plazo las adherencias locorregionales pueden causar dolor abdominal y pélvico crónico, infertilidad y obstrucción intestinal, requiriendo en algunos casos sucesivos ingresos hospitalarios y relaparotomías. La obstrucción intestinal es la consecuencia más grave y frecuente de las adherencias.

En un estudio clásico en el que se incluyeron 18.912 pacientes en los que se había realizado algún procedimiento abdominal, en los dos años posteriores a una cirugía digestiva con resección intestinal y anastomosis un 14,3% de los pacientes presentaron obstrucción intestinal, un 2,6% requirieron adhesiolisis por obstrucción y un 12,9% tuvieron que ser sometidos de nuevo a cirugía. Después de otras operaciones intestinales, 17% de los pacientes tuvieron episodios de obstrucción intestinal, 3,1% precisaron cirugía por esta causa y 20,2% requirieron otras cirugías colorrectales o de cirugía general ⁷⁹. Otros estudios confirman estas cifras cuando se analizan las obstrucciones intestinales tras colectomía subtotal o total (18%), aumentando el riesgo de aparición en el primer año de 11% a un 30% a los diez años ⁸⁰. En otros estudios con menos pacientes estas cifras son algo menores. Tras cirugía colorrectal alrededor de un

3,6% de los pacientes reingresan por obstrucción intestinal y un 38% de ellos precisan cirugía⁸¹. La obstrucción intestinal postoperatoria se ha descrito como un motivo importante de aumento del tiempo de baja laboral y de los costes hospitalarios^{67, 82, 83}. Su mortalidad varía desde 3% hasta un 30% si el intestino se necrosa o perfora^{84, 85}.

Hasta un 5% de pacientes con cirugía ginecológica vía laparotómica requieren reingresos por esta causa y un 37% de los pacientes con obstrucción intestinal debida a adherencias precisan cirugía para solucionar el cuadro⁸⁶.

La cirugía ginecológica es la segunda causa más frecuente de obstrucción intestinal postoperatoria por adherencias (11,7%-22%) tras la cirugía colorrectal (20,8%-24%). Otras causas menos frecuentes son la apendicectomía (14%-23,3%), la cirugía de hernias de pared abdominal (15%), la cirugía del tracto gastrointestinal superior (9,2%) o la cirugía de intestino delgado (8,3%)^{87, 88, 89}.

Parece que la vía de abordaje de la cirugía también influye en la formación de adherencias peritoneales. La formación de adherencias *de novo* es menor en caso de laparoscopias que de laparotomías^{90, 91, 92}. Por esta razón muchos autores recomiendan que si es necesaria adhesiolisis en caso obstrucción intestinal, dolor pélvico o infertilidad, ésta también se lleve a cabo por vía laparoscópica si es posible. En contra de esta vía de abordaje se ha descrito en algunos estudios una mayor incidencia de perforación intestinal en los casos de obstrucción intestinal^{93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100}.

Se han definido tres métodos para intentar disminuir las adherencias basándose en la fisiopatología de su aparición: 1) disminuir la actividad inflamatoria, 2) facilitar la degradación de la fibrina con agentes estimuladores de la fibrinolisis y 3) separar las superficies abdominales durante los días en que la fibrina puede unirlos. Los posibles efectos secundarios de los dos primeros han hecho que el tercer método sea el que más se haya estudiado¹⁰¹.

El **primer método** descrito tiene el inconveniente de que al disminuir la actividad inflamatoria puede aumentar la tasa de infección y empeorar la cicatrización. Se han investigado varios agentes con actividad antiinflamatoria, como el TNP-470 (cuyos efectos secundarios son retraso en la cicatrización y neurotoxicidad) o los inhibidores de la COX-2, en especial el celecoxib. Éste último es más eficaz que otros antiinflamatorios no selectivos en la disminución de las adherencias peritoneales, pero tiene efectos secundarios cardiovasculares ^{102, 103, 104, 105}.

Mediante el **segundo método** para evitar la formación de adherencias peritoneales, facilitar la degradación de la fibrina, se puede provocar hemorragia al aumentar la fibrinólisis ^{106, 107}.

Por lo que respecta al **tercer método**, existen numerosos compuestos antiadherenciales en desarrollo (Tabla 3). Una de las opciones para evitar la formación de adherencias es la utilización de icodextrina (Adept®). Es un polímero de glucosa cuyo objetivo es mantener las superficies peritoneales separadas durante los primeros días del postoperatorio al formar una barrera líquida (icodextrina al 4%) entre ellas, mecanismo que se conoce como hidroflotación ^{108, 109}. Permanece en la cavidad abdominal porque su absorción capilar es mínima debido a su alto peso molecular, y tan sólo presenta aclaramiento gradual por el sistema linfático. Al pasar a la sangre se metaboliza rápidamente por la amilasa plasmática, que la hidroliza en maltosa e isomaltosa ¹¹⁰. Este polímero se usa a diferentes concentraciones para otros propósitos: solución para diálisis peritoneal en la insuficiencia renal crónica (7,5%, Extraneal®), o vehículo de quimioterapia intraperitoneal (4%, Dexemel®) ^{111, 112, 113}.

Tipo de compuesto	Nombre comercial
Icodextrina al 4%	Adept®
Carboximetilcelulosa- hialuronato sódico	Seprafilm®, Sepracoat®
Celulosa oxidada regenerada	Interceed®
Hialuronato férrico	Intergel®

Tabla 3. Agentes utilizados para evitar la formación de adherencias.

El objetivo de todos ellos es separar las superficies peritoneales en el postoperatorio inmediato para evitar la formación de los puentes de fibrina.

Otra de las opciones para reducir las adherencias postoperatorias es el uso de membranas reabsorbibles. Las de ácido hialurónico-carboximetilcelulosa (Sepracoat®, Seprafilm®) son láminas transparentes que se colocan recubriendo todas las superficies peritoneales susceptibles de producir adherencias. Actúan como método de barrera mediante un efecto puramente físico, sin alterar la fibrinólisis peritoneal (no producen alteraciones en los niveles de tPA, PAI-1 o PAI-2)¹¹⁴. El ácido hialurónico es un glicosaminglicano compuesto de unidades repetidas de N-acetil-D-glucosamina y ácido glucurónico. La carboximetilcelulosa es un derivado de la celulosa con carboximetilación de los grupos hidroxilo glucosídicos, lo que convierte al polímero en un compuesto más hidrófilo. Con la combinación de ambos compuestos se consigue una membrana que se transforma en gel en contacto con las superficies peritoneales y que se reabsorbe de forma espontánea¹¹⁵. Se han comunicado casos, excepcionales, de peritonitis aséptica secundaria al uso de esta membrana^{116, 117}.

Otra barrera antiadherencial es la celulosa oxidada regenerada (Interceed®). Por hidrólisis pasa a forma de gel a las ocho horas de haber sido aplicada a los tejidos. Se

absorbe por completo en 28 días en la cavidad peritoneal y su modo de actuación es también puramente físico¹¹⁸.

Por otra parte, el ácido hialurónico en forma de gel también se utiliza para evitar las adherencias^{119, 120}. Es un polímero de elevado peso molecular que en condiciones fisiológicas forma una solución viscosa que minimiza la desecación serosa y reduce la formación de adherencias. A diferencia de otros polímeros, el ácido hialurónico debe ser instilado en el peritoneo antes de la agresión peritoneal para ser efectivo. El hialuronato férrico (Intergel®) es una forma más viscosa y con una vida media mayor que el ácido hialurónico aislado. Se ha utilizado para disminuir las adherencias intrauterinas y peritoneales^{121, 122}.

Como método de barrera también deben ser considerados los hidrogeles. Son la combinación de dos polímeros líquidos que al unirse forman en unos minutos un polímero sólido que actúa como método de barrera. Se aplican mediante pulverización, lo que facilita su uso en laparoscopia. También los geles viscoelásticos (óxido de polietileno y carboximetilcelulosa estabilizados con cloruro de calcio) se han utilizado con el mismo objetivo^{123, 124}.

Otros agentes que se han probado en modelos animales con resultados no concluyentes son la vitamina E (porque disminuye la producción de colágeno), la campotecina (sustancia con efecto antiinflamatorio, antiproliferativo y antiangiogénico), el cromoglicato de sodio (estabiliza las membranas celulares), el ibuprofeno en polietilenglicol (por sus propiedades antiinflamatorias) y diversos polipéptidos¹²⁵. Recientemente se ha publicado un estudio (en ratas) en el que la instilación intraperitoneal de poli-L-lisina y poli-L-glutamato tras la realización de una anastomosis cólica redujo la formación de adherencias y no interfirió con la cicatrización intestinal¹²⁶.

El uso de agentes físicos para disminuir las adherencias postoperatorias es controvertido cuando se realiza una anastomosis intestinal. Como hemos comentado, la disminución de las adherencias cercanas a las anastomosis podría ser responsable de que éstas tuvieran una menor resistencia y por lo tanto mayor riesgo de dehiscencia ^{127, 78}. Sin embargo, algunos estudios en animales han señalado que su uso no interfiere en la cicatrización cólica ^{128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 135}.

Al analizar los resultados de los trabajos en animales nos encontramos con que difieren mucho en cantidad de animales utilizados y días postoperatorios en los que se realiza la medida de la presión de ruptura. En general miden la resistencia de la anastomosis a partir del séptimo día de la cirugía, cuando el período crítico ya ha pasado. Por lo tanto, aunque no haya habido mortalidad por peritonitis (podría deberse al escaso número de animales o al umbral de resistencia a las peritonitis de la rata o del conejo) no sabemos si ha existido dehiscencia anastomótica precoz o disminución de la presión al cuarto día postoperatorio.

Si tenemos en cuenta uno de los últimos ensayos clínicos en humanos en que se usó la membrana reabsorbible de ácido hialurónico-carboximetilcelulosa como barrera física para la producción de adherencias, el subgrupo de pacientes en los que se utilizó el recubrimiento de las anastomosis intestinales experimentó un mayor índice de complicaciones relacionadas con dehiscencia de la sutura (fuga anastomótica, fístula intestinal, peritonitis, abscesos y sepsis) de manera estadísticamente significativa respecto al grupo control ($p < 0,05$) ¹³⁶.

En ensayos clínicos recientes en los que se ha usado membrana reabsorbible de ácido hialurónico-carboximetilcelulosa para evitar las adherencias tras peritonectomía y resección anterior baja por cáncer de ovario, la anastomosis intestinal no se envuelve en ella ¹³⁷.

Un ensayo clínico reciente aleatorizado y controlado en el que se ha usado hialuronato férrico en forma de gel en resecciones colorrectales para disminuir las adherencias postoperatorias ha tenido que ser suspendido por mayor morbilidad en el grupo tratado que en el grupo control (65% versus 27%, p 0,031), incluida una mayor aparición de dehiscencias anastomóticas (p 0,178) ¹³⁸.

En el caso de la icodextrina al 4%, sin embargo, el mayor estudio clínico realizado por el momento no ha encontrado diferencias en la incidencia de aparición de fugas anastomóticas respecto a la literatura previa ¹³⁹.

Aunque cuando comenzaron a utilizarse estos métodos de barrera física para la producción de adherencias parecía que no que tenían efecto sobre la cicatrización de las anastomosis ¹⁴⁰, lo cierto es que, en general, en los últimos ensayos clínicos sí que parece encontrarse un efecto deletéreo sobre la cicatrización intestinal.

2. Terapia celular

Definición de célula madre

El término célula madre (*stem cell*) se utiliza para definir una célula indiferenciada con dos propiedades: por un lado la autorregeneración y, por otro, la capacidad de dar lugar a diferentes líneas de células especializadas. Es decir, son células con capacidad de división asimétrica: pueden producir una réplica celular exacta de sí mismas y una célula con capacidad de realizar una función más especializada.

Según su potencialidad las células madre pueden clasificarse en:

- a) Células madre totipotentes: corresponden a las células madre más primitivas, capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario. Están presentes en el cigoto después de las tres primeras divisiones.
- b) Células madre pluripotentes: son aquellas células capaces de diferenciarse en cualquier célula del tejido del organismo adulto (pueden dar lugar a células de tejidos procedentes de las tres capas embrionarias: endodermo, ectodermo y mesodermo).
- c) Células madre multipotentes: tienen una capacidad de diferenciación más restringida, son capaces de dar lugar a las células de los tejidos procedentes de la misma capa embrionaria.

Las células madre están presentes en el embrión (células madre embrionarias) pero sorprendentemente están también presentes en diferentes tejidos del organismo adulto (células madre adultas).

Las células madre embrionarias son células con las características descritas obtenidas de un blastocisto. Una vez aisladas de la masa celular interna del embrión en este estadio pueden mantenerse en cultivo de forma indiferenciada porque se dividen indefinidamente, y constituyen una fuente de progenitores de células de las tres capas embrionarias: endodermo, ectodermo y mesodermo. Su aislamiento y cultivo se consiguió por primera vez en 1981 ¹⁴¹.

Las **células madre adultas** se encuentran en tejidos órgano-específicos desde después del nacimiento hasta la edad adulta. Hasta hace poco se pensaba que las células progenitoras existentes en los tejidos adultos estaban determinadas para dar lugar al tipo de célula especializada de ese tejido (células multipotenciales). Por ejemplo, las células progenitoras de las criptas intestinales o de la piel. Sin embargo, se ha comprobado que hay células madre en tejidos adultos con capacidad de *transdiferenciación*, es decir, con capacidad de dar lugar a múltiples líneas celulares de las tres capas embrionarias (células pluripotenciales). Por ejemplo, a partir de células madre de médula ósea se han obtenido neuronas, hepatocitos, células de músculo cardíaco y de músculo esquelético. Todavía no se ha establecido el mecanismo por el cual las células madre adultas presentan esta capacidad de transdiferenciación, aunque existen dos teorías principalmente que intentan explicarla. La primera tiene relación con la *fusión* entre las células madre adultas y las células del ambiente en el que se encuentran. Cuando se cultivan células madre adultas con células madre embrionarias algunas de ellas se fusionan y, de la misma manera, algunas de las células madre que se trasplantan se fusionan con células del receptor, apareciendo nuevas células con una mezcla del citoplasma de ambas ^{142, 143, 144, 145, 146}. La segunda teoría se relaciona con la posibilidad de que el *microambiente* o *nicho* en el que se encuentren las células sea lo que promueva la transdiferenciación a una determinada línea celular ^{147, 148, 149}.

La capacidad de transdiferenciación, junto con la habilidad de migrar desde sus tejidos de origen hacia tejidos que están en proceso de remodelación, señalan el gran potencial de las células madre adultas en los procesos de regeneración y cicatrización de tejidos. Su amplia distribución en los tejidos del adulto las convierte en una fuente accesible y exenta de problemas éticos de células madre. Uno de los tejidos más estudiados como banco celular es la médula ósea.

En la médula ósea existe, además de la población de células madre hematopoyéticas, otra población de células a las que en un principio tan sólo se les atribuyó una función de soporte: las células madre mesenquimales (*mesenchymal stem cells*, MSC). A partir de las MSC de médula ósea se han obtenido diferentes líneas celulares y constituyen un banco muy importante de células madre adultas. De hecho, la mayoría de los estudios con células madre adultas se llevan a cabo con este tipo de células. Posteriormente a su descubrimiento se han encontrado células mesenquimales con la misma morfología, y capacidad de diferenciación en el tejido adiposo, lo que supone una fuente más accesible y extensa de MSC ^{150, 151}. De hecho parece que la proporción de células madre en tejido adiposo es mayor que en médula ósea. Se ha comprobado que no hay diferencias entre las células mesenquimales de médula ósea y de tejido adiposo del mismo paciente en cinética de crecimiento, senescencia celular, capacidad de diferenciación multilínea ni eficacia en transducción génica, lo que las convierte en células casi idénticas, con la diferencia de su fuente de origen ¹⁵² y del nivel de expresión de dos marcadores celulares ¹⁵³. Las MSC de tejido adiposo expresan CD49d (integrina alfa4) y las de médula ósea no. Por el contrario, las MSC de médula ósea expresan CD106 (VCAM), marcador que no tienen las MSC de tejido adiposo.

Se ha comprobado que las células madre derivadas de tejido adiposo también pueden diferenciarse *in vitro*, como las de médula ósea, a líneas de adipocitos^{153, 154}, miocitos^{153, 155, 156}, condrocitos^{153, 157}, osteocitos^{158, 159}, células con fenotipo neuronal^{153, 160}, células productoras de insulina, glucagón y somatostatina¹⁶¹, cardiomiocitos^{162, 163}, endotelio vascular¹⁶⁴, células epiteliales¹⁶⁵ y hepatocitos¹⁶⁶.

Recientemente se ha descrito otra propiedad de las células madre mesenquimales, tanto de las procedentes de médula ósea como de las procedentes de tejido adiposo: un efecto inmunomodulador. *In vitro* las células madre adultas derivadas de tejido adiposo no provocan respuesta de linfocitos alogénicos e inhiben la proliferación de linfocitos inducida por mitógenos o por células mononucleares alogénicas de sangre periférica^{167, 168, 169, 170, 171, 172}.

Células madre adultas y cicatrización

Como se ha comentado, las células madre adultas son células progenitoras pluripotenciales (pueden dar lugar a células de las tres capas embrionarias: endodermo, ectodermo y mesodermo). Por esta razón se ha investigado su participación en los procesos de cicatrización además de su uso como banco de células para regenerar tejidos dañados. *In vivo* se ha demostrado que las células madre de la médula ósea acuden a las zonas del cuerpo en las que se produce daño tisular. Por ejemplo, a la piel cuando hay una herida¹⁷³. En las tres fases clásicas de la cicatrización de las heridas, inflamatoria, proliferativa y de remodelación, parece que la médula ósea aporta a la piel dañada no sólo células inflamatorias y progenitores endoteliales, sino también células madre, que juegan un papel preponderante y hasta ahora desconocido en todas las fases de la cicatrización. Trasplantando células madre de médula ósea marcadas con una proteína fluorescente verde (GFP) a ratones que carecen de esta proteína se vio que

estas células acuden a la piel normal, pero que el reclutamiento celular hacia la piel se incrementa considerablemente cuando la piel se daña ¹⁷⁴. Las células madre se incorporan en gran número a las heridas e intervienen en la reparación de la dermis, dando lugar a cicatrices más finas y más parecidas a la piel normal que las habituales. También cuando estas células son aportadas localmente a un lecho donde están activos procesos de reparación de la piel (mediante herida o quemadura) se obtienen resultados de cicatrización parecidos ^{175, 176}.

Hay otro ejemplo de cómo mediante el aporte de células madre se consigue una cicatrización más fisiológica: en ratones, recubriendo los injertos tendinosos que se usan para reemplazar el ligamento cruzado anterior de la rodilla con células madre mesenquimales, se ha visto que la unión tendón-hueso (la zona de daño tisular y reparación) tiene más cartílago que si los injertos no se recubren con células madre, con lo que se consigue una unión más parecida a la del ligamento cruzado anterior original. Además, a las ocho semanas de la cirugía, la resistencia de los tendones recubiertos de células es mayor que la de los injertos tendinosos convencionales ¹⁷⁷.

Terapia celular

La terapia celular consiste en el trasplante de células vivas con el fin de curar o mejorar un determinado proceso, es decir, con fines terapéuticos (Figura 10). Según el origen de las células puede ser autóloga (se usan células del propio individuo), alogénica (trasplante de células entre individuos de la misma especie) o xenogénica (trasplante celular entre individuos de distinta especie). Es una realidad hoy en día en continuo avance y existen numerosos proyectos de investigación en el mundo relacionados con el uso de células madre. La Medicina Regenerativa es un concepto teórico por el momento, que se basa en la obtención en el laboratorio de órganos con

todas sus funciones a partir de células madre. Podríamos decir que, en un futuro, el escenario más avanzado de terapia celular será la Medicina Regenerativa ¹⁷⁸.

Procesos y productos de terapia celular

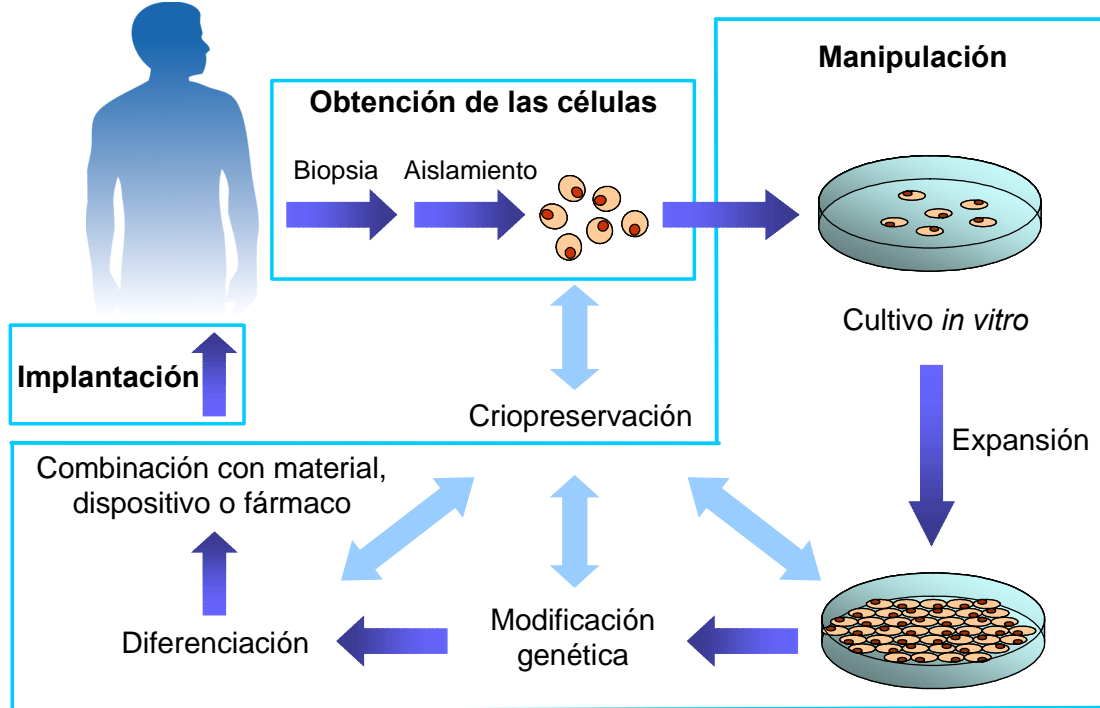


Figura 10. Esquema del proceso de terapia celular.

En la actualidad hay 536 ensayos clínicos en marcha relacionados con terapia celular, aunque son cifras que cambian cada día (www.clinicaltrials.com) ¹⁷⁹. La mayoría de ellos se llevan a cabo en Estados Unidos y están relacionados con enfermedades hematológicas. Resulta destacable la aplicación de la terapia celular en reparación miocárdica (22 ensayos clínicos), tanto en infarto agudo de miocardio como en cardiopatía isquémica crónica. En la mayoría de estos ensayos se usan células madre adultas procedentes de médula ósea y la inyección se lleva a cabo mediante punción

intracoronaria (especialmente indicada en casos de IAM tras colocación de stent) o intramiocárdica. Su objetivo es mejorar la función del miocardio, según algunos investigadores, estimulando la neoangiogénesis^{180, 181, 182, 183, 184}.

Menos avanzados se encuentran otros campos de trabajo, como las enfermedades neurodegenerativas, la diabetes o la regeneración hepática. La enfermedad de Parkinson y la Esclerosis Lateral Amiotrófica se consideran dos de los escenarios más apropiados para el uso de células madre dentro de las enfermedades neurodegenerativas. En ambos casos los estudios realizados en animales son esperanzadores. En la enfermedad de Parkinson, la mayoría de los ensayos consisten en la transdiferenciación *in vitro* de las células madre a neuronas dopaminérgicas para su posterior trasplante en la sustancia negra. Existe un ensayo clínico en curso cuyo objetivo es ese: movilizar células madre de médula ósea para extraerlas de sangre periférica mediante aféresis y lograr su transdiferenciación^{185, 186, 187, 188, 189}.

El tratamiento de la diabetes mediante células madre está tomando varios caminos. Por un lado, la consecución de células beta productoras de insulina a partir de células madre, ya sean embrionarias o adultas. Y por otro lado, la inducción de tolerancia por parte de las células madre de los antígenos de las células beta pancreáticas, ya sean trasplantadas o las propias del paciente en casos de diabetes de reciente diagnóstico^{190, 191, 179}.

La regeneración hepática mediante células madre se está ensayando en tres categorías de enfermedad: el fallo hepático agudo, las enfermedades metabólicas hepáticas y la cirrosis. En las tres se han realizado trasplantes celulares en humanos en casos aislados y con resultados dispares. La vía de administración en las dos primeras categorías, que conservan el parénquima hepático intacto, es la inyección celular en la vena porta o en la vena mesentérica inferior. En la cirrosis esta vía podría empeorar la

hipertensión portal, e incluso causar embolización pulmonar, por lo que se prefiere la inyección ectópica de las células. El bazo es el lugar más estudiado. Los problemas a los que se enfrenta el trasplante hepático de células madre son similares a los de otros campos: la inmunotolerancia, la evidencia de formación de tejido hepático y su funcionalidad^{192, 193, 194, 195}.

Hay más escenarios clínicos en los que se está aplicando la terapia celular, muchos de ellos con **células madre derivadas de tejido adiposo**: regeneración ósea^{196, 197, 198, 199, 200, 201} y del cartílago articular^{202, 203, 204}, regeneración del tejido nervioso²⁰⁵ y muscular^{206, 207}, el tratamiento de enfermedades inmunológicas²⁰⁸, el proceso de cicatrización...pero todavía no se sabe si todas las esperanzas depositadas en la terapia celular se cumplirán.

En nuestro grupo de trabajo se han desarrollado dos estudios de investigación clínica dentro del marco de Ensayo Clínico correspondiente a Fase I y Fase II²⁰⁹, en los que se han implantado células madre adultas autólogas derivadas de tejido adiposo para el tratamiento de fístulas complejas.

En el primero de ellos se incluyeron cuatro pacientes con Enfermedad de Crohn de al menos cinco años de evolución y fístulas complejas (enterocutáneas, rectovaginales o perianales con trayectos supraesfinterianos altos, transesfinterianos altos o extraesfinterianos) que no hubiesen respondido a tratamiento médico ni a tratamiento quirúrgico (al menos dos operaciones previas). Mediante liposucción se obtuvo el tejido adiposo del que se aislaron las células madre adultas que se iban a implantar posteriormente. La intervención quirúrgica varió según el tipo de fístula. En las enterocutáneas se realizó legrado de los trayectos, inoculación de las células madre adultas y sellado con pegamento de fibrina; en las rectovaginales cirugía de la fístula e inyección celular y en las perianales resección del trayecto hasta el orificio interno,

cierre del mismo con un punto de material reabsorbible e inyección de las células madre adultas en las paredes del trayecto reseado y en el orificio interno. En total se trataron ocho fístulas de las que se realizó seguimiento semanal durante dos meses, momento en el que se consideró que había curación si se evidenciaba reepitelización total del orificio externo. El tratamiento fue eficaz en seis de los ocho casos (las fístulas siguen cerradas actualmente, más de 3 años después del tratamiento), en los otros dos tan sólo se encontró un cierre parcial del orificio externo y, lo más importante, se demostró la factibilidad y seguridad de la terapia celular con células madre adultas autólogas derivadas de tejido adiposo en patología fistulosa.

En el ensayo clínico en Fase II multicéntrico se incluyeron 50 pacientes con patología fistulosa perianal compleja, en pacientes con enfermedad de Crohn y sin ella, en los que se comparó la terapia celular con células madre adultas autólogas derivadas de tejido adiposo con un tratamiento convencional (adhesivo tisular de fibrina). En nuestro hospital se reclutaron 26 pacientes que se aleatorizaron, quedando trece en el grupo de terapia celular y trece en el grupo control. Los pacientes del grupo de terapia celular se sometieron a una liposucción para obtener el tejido adiposo, materia prima para la obtención de las células madre adultas. Desde el año 2003, las células somáticas manipuladas ex vivo (por ejemplo una expansión in vitro) se consideran medicamentos de terapia celular somática y por ello se deben cumplir las normas de correcta fabricación (Directiva 2003/63/CE y Orden SCO 3461/2003). Por ello el procesamiento del tejido adiposo, el aislamiento y posterior expansión en cultivo in vitro de las células madre adultas de cada paciente fue realizado por el laboratorio farmacéutico Cellerix (nº 4.190) acreditado por la Agencia Española del Medicamento para la fabricación de medicamentos de terapia celular somática en fase de investigación clínica.

Una vez obtenido el medicamento, la suspensión de células madre adultas autólogas derivadas de tejido adiposo, el paciente era sometido a la siguiente intervención: legrado de los trayectos fistulosos, cierre del orificio interno con sutura reabsorbible, inyección celular en las paredes de los trayectos, sellado de los mismos con adhesivo tisular de fibrina e inyección celular de nuevo en el espesor de la fibrina. En los pacientes del grupo control no se realizó liposucción y se practicó la misma cirugía sin implante celular. Todos los pacientes tanto los que recibieron el medicamento de terapia celular con los pacientes del grupo control tratados con el medicamento control fueron sometidos a un seguimiento postratamiento y se estableció como variable del estudio el estado de curación a la octava semana postratamiento. Los resultados de este estudio están siendo actualmente analizados y evaluados por las agencias regulatorias española (AEM) y europea (EMA) y aún no pueden ser mostrados públicamente. Sirva mientras tanto como orientación que los resultados muestran una tendencia curativa muy positiva y que pacientes cuyo seguimiento postratamiento es superior a un año han mostrado la permanencia de la eficacia del tratamiento en el cierre de las fístulas y la seguridad de este tipo de terapia celular.

3. Hipótesis de trabajo

Basándonos en el conocimiento actual sobre terapia celular y nuestra experiencia en anastomosis de colon, pensamos que las suturas convencionales recubiertas de células madre autólogas podrían mejorar el proceso de cicatrización de las mismas y, por consiguiente, disminuir el número de dehiscencias de este tipo de cirugía.

Para poder demostrar este supuesto planteamos un experimento en anastomosis cólicas en ratas. El objetivo es comparar anastomosis colo-cólicas realizadas con hilos de sutura recubiertos de células madre adultas derivadas de tejido adiposo, con anastomosis realizadas con hilos convencionales, a diversos periodos de tiempo postoperatorio. A esta sutura con células madre la denominamos “biosutura”.

En un segundo tiempo comprobamos el efecto de las biosuturas en anastomosis cólicas en un entorno sin adherencias, porque pensamos que podrían contribuir a mejorar los resultados de este tipo de anastomosis digestivas consideradas críticas. Para evitar la formación de adherencias peritoneales postoperatorias planteamos dos modelos. En el primer modelo recubrimos una anastomosis colo-cólica con una lámina de látex (frena la formación de adherencias alrededor de la línea de sutura y empeora la cicatrización^{210, 5)} y en el segundo modelo dejamos la anastomosis colo-cólica en un baño de icodextrina al 4% intraperitoneal. Ambos modelos se evalúan al cuarto día postoperatorio.

OBJETIVOS

- Obtención de hilos de sutura recubiertos de células madre adultas derivadas de tejido adiposo, a las que denominamos biosuturas.
- Comparar la calidad de las anastomosis cólicas realizadas con biosuturas con la de las anastomosis cólicas realizadas con hilos convencionales en un modelo animal.
- Buscar un modelo de anastomosis cólica en un entorno sin adherencias (anastomosis crítica) y comprobar si su resistencia es menor que en el entorno habitual del peritoneo.
- Comprobar el efecto de los hilos recubiertos de células madre, biosuturas, en una anastomosis crítica.

MATERIAL Y MÉTODO

1. Animales

Se usaron noventa y tres ratas: ochenta y tres ejemplares adultos de rata BDIX y diez ejemplares adultos de rata Sprague-Dawley.

- Obtención de células madre adultas derivadas de tejido adiposo: a dos ratas BDIX se les extrajo grasa del tejido adiposo subcutáneo para obtener las células madre adultas que posteriormente se usaron para recubrir los hilos que se iban a utilizar en todos los demás ejemplares. (La cepa BDIX fue seleccionada por ser una cepa singénica cuya alta homología genética entre los individuos que la constituyen permite que las células de la rata donadora no sean rechazadas inmunológicamente por la rata receptora).
- Anastomosis cólicas estándar: en este grupo se usaron cuarenta ratas BDIX para realizar las anastomosis del colon, divididas en subgrupos de diez animales cada uno.
- Anastomosis cólicas críticas: se usaron 19 ratas BDIX en el modelo de anastomosis crítica con lámina de látex, diez ejemplares de rata Sprague-Dawley para establecer el modelo de anastomosis crítica con icodextrina al 4% y 22 ratas BDIX en el modelo de anastomosis crítica con icodextrina al 4% y biosuturas.

Los animales que se iban a operar se estabularon antes de la cirugía en el lugar de la experimentación para su adaptación. En las colonias de procedencia todos los controles sanitarios fueron negativos (muestreo perfil FELASA y muestreo para detección de parásitos en heces y coprocultivo realizados por “Laboratorio de Diagnóstico General”, Barcelona).

2. Material

Material anestésico

Se utilizan ketamina (Ketolar ®, vial 500 mg/10 ml), atropina (Atropina, ampolla 1 mg/ml) y diazepam (Valium ®, ampolla 10 mg/2 ml) y jeringas con aguja de insulina para su inyección.

Material quirúrgico

El hilo usado para la anastomosis cólica es polyglactin 910 de 4/0, con aguja cilíndrica de ½ de circunferencia y hebra de 30 cm de longitud. Se trata de un multifilamento trenzado compuesto por un 90% de glicólico y un 10% de L-láctico. Se reabsorbe por hidrólisis liberando agua y CO₂, de forma independiente de la actividad celular o enzimática, desapareciendo por completo a los a los 70 días de su utilización

211 .

Otros materiales usados son clorhexidina, bisturíes del número 11 desechables, gasas y compresas e instrumental quirúrgico básico.

Material de medida de las variables

Las ratas se sacrifican por decapitación con guillotina. Para extraer el colon de la cavidad abdominal se usa instrumental quirúrgico básico. Cada pieza se mantiene en suero fisiológico hasta la medida de la presión de ruptura.

Se utiliza una bomba de infusión con jeringa de 50 ml cargada con suero fisiológico con azul de metileno (1 ml de azul de metileno en 50 ml de suero fisiológico) que se programa a 99 ml/min para la perfusión de líquido dentro del colon resecado y así conseguir un aumento paulatino de presión intraluminal. Esta presión intraluminal se registra mediante un polígrafo conectado a un ordenador que procesa la información con el programa Polygram 98 Diagnostics Workstation (Medtronic Functional Diagnostics A/S 1998-2000). Ambos sistemas (la bomba de infusión continua y el canal de manometría) y el colon con la anastomosis se conectan mediante una llave de tres pasos.

Una vez medida la presión de ruptura cada pieza se mantiene en formol al 20% para su estudio anatomopatológico posterior.

Para el examen histológico de las piezas se utiliza el material habitual para el procesamiento con hemaoxilina-eosina de las muestras de anatomía patológica.

3. Métodos

Método de obtención de células madre adultas de tejido adiposo de rata

Se utilizan dos ratas de la cepa BDIX (ratas singénicas) machos, cuyo peso fue de 353 g y 351 g. Se anestesian con una solución de 1 ml de ketamina, 1 ml de xilacina 2% y 18 ml de PBS mediante inyección intraperitoneal, administrándose la cantidad necesaria para mantener la relación 0,3 ml de anestesia por 20 gramos de peso de la rata.

Después de la inyección se coloca al animal en una incubadora con fuente de calor hasta percibir que se está anestesiado (al presionarle la pata no se recibe respuesta).

Una vez anestesiado se extrae el tejido adiposo subdérmico mediante corte con tijeras. Este procede principalmente de las regiones axilares e inguinales del animal.

El tejido adiposo aislado se lava un par de veces con tampón salino antes de ser disgregado físicamente utilizando un bisturí o tijeras en fragmentos lo más pequeños posible. Posteriormente, los fragmentos adiposos son sometidos durante 30 minutos a digestión enzimática al añadir colagenasa de tipo I a una concentración final de 0,075% y aplicar agitación rotacional a una temperatura ambiental de 37°C. Transcurridos los 30 minutos se neutraliza la reacción enzimática añadiendo suero fetal bovino (1/10 del volumen de la suspensión de fragmentos adiposos digeridos). Para recolectar las células individualizadas después de la digestión de los fragmentos adiposos, la muestra se centrifuga a 300 g durante 10 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). El agregado celular es resuspendido en medio de cultivo celular (DMEM, 10% suero fetal bovino, 2mM Glutamina, 1% antibiótico (estreptomicina 10 µg/ml / penicilina 1 UI/ml) y a continuación se filtra a través de una malla de 40 micras de diámetro de poro, para separar las células de posibles fibras o restos de tejido no disgregado.

Obtenida la suspensión de células individualizadas, se procede al recuento de las células viables, según el método de exclusión por tinción con azul tripán.

Una vez conocida la cantidad de células conseguidas del tejido adiposo subcutáneo de partida, las células se siembran a razón de 20.000-30.000 células por centímetro cuadrado de superficie plástica de los recipientes de cultivo celular. Una vez dispensadas las células en los recipientes de cultivo, éstos se trasladan a incubadores que proporcionan las condiciones adecuadas para el cultivo celular (temperatura de 37°C, 5% de CO₂ y 90-95% de humedad relativa). Transcurridas entre 20 y 24 horas

postsiembra se observan en los recipientes de cultivo numerosas células adheridas al plástico de cultivo con formas triangulares, de color grisáceo o negruzco (Figura 11).

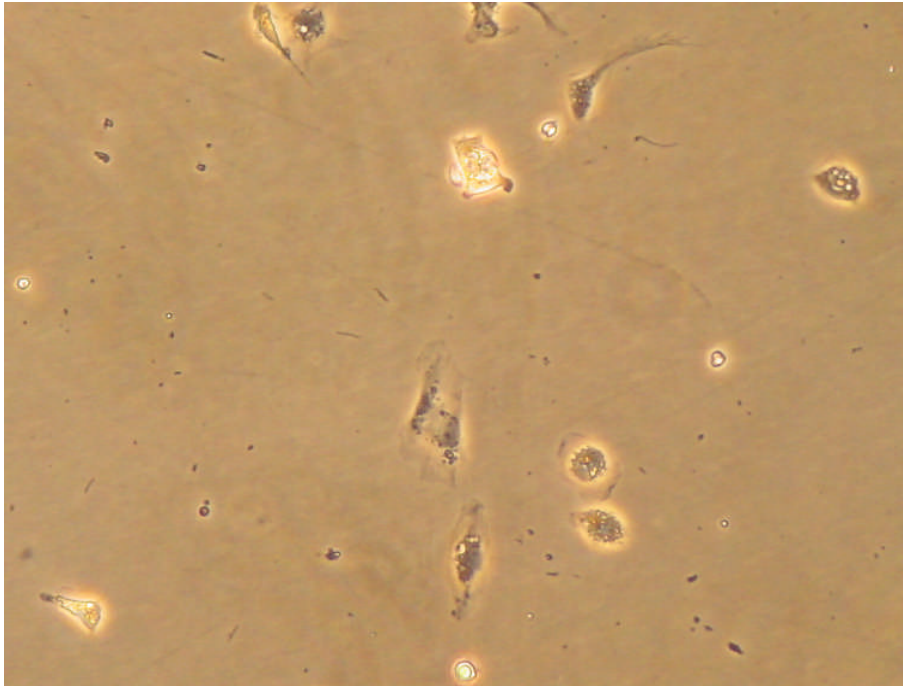


Figura 11. Aspecto de las células a las 24 horas de la siembra (microscopio campo claro 100 x).

También se observan células flotantes (adipocitos maduros, células sanguíneas, restos celulares...) que son retiradas mediante la aspiración del medio de cultivo y el lavado de los cultivos con tampón fosfato salino. Después del lavado se añade de nuevo medio de cultivo que se cambia cada 3-4 días. Con el paso de los días las células crecen, se extienden y al dividirse van ocupando mayor superficie de los recipientes de cultivo hasta cubrir toda la superficie disponible (Figura 12).

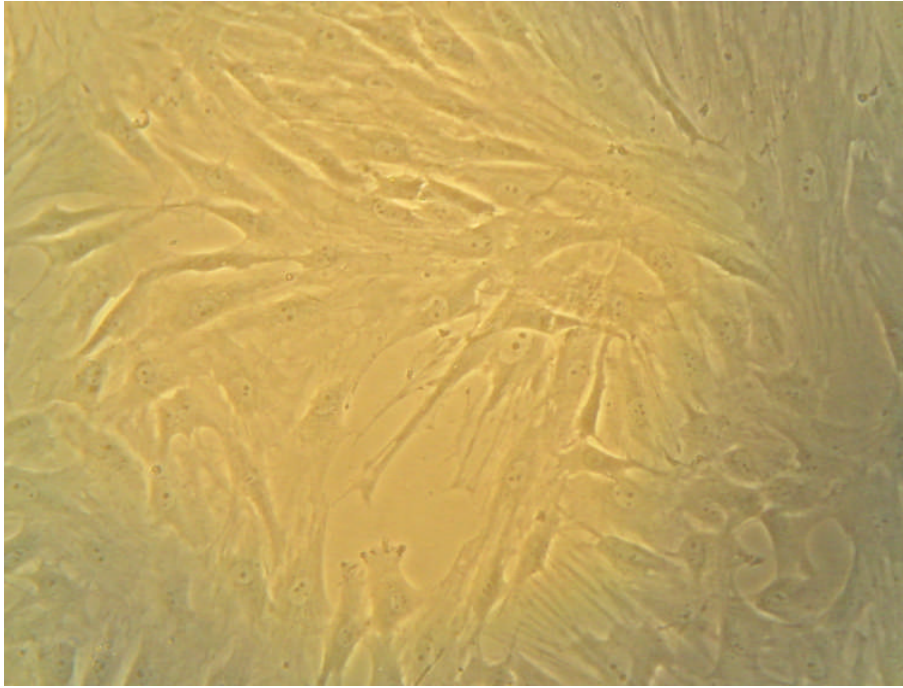


Figura 12. Aspecto de las células al octavo día del inicio del cultivo. (Microscopio campo claro 50 x).

Alcanzado el 90% de confluencia de las células en el recipiente de cultivo, las células se despegan del plástico de cultivo con tripsina/EDTA. Para ello se retira el medio de cultivo y el cultivo celular se lava dos veces con tampón fosfato salino. Se añade tripsina/EDTA en la cantidad mínima suficiente para cubrir el cultivo celular y se incuban a 37 °C durante el tiempo mínimo necesario para que las células se despeguen. Para neutralizar la acción de la tripsina/EDTA, las células se recogen añadiendo un volumen igual de medio de cultivo y la suspensión celular se centrifuga a razón de 300g/ 10 min/ temperatura ambiente. De nuevo se cuentan las células obtenidas y se subcultivan sucesivamente a razón de 5000 cels/cm² hasta obtener la cantidad de células necesarias. Durante el proceso de expansión celular, algunas de las células se criopreservan en una solución de 10% de dimetilsulfóxido en suero fetal bovino y se almacenan en nitrógeno hasta su futura utilización.

Obtenidas las células madre adultas de tejido adiposo, que tienen capacidad de adhesión al plástico de los recipientes de cultivo, debemos ensayar si esa capacidad de adhesión se mantiene en el caso de la superficie de los hilos de sutura. Para poder visualizar las células en los hilos éstas se modifican mediante la transducción de partículas retrovirales con el kit RetroFect (Cellerix S.L., Madrid, España) para que expresen la proteína CopGFP (*green fluorescence protein*). (Figura 13).

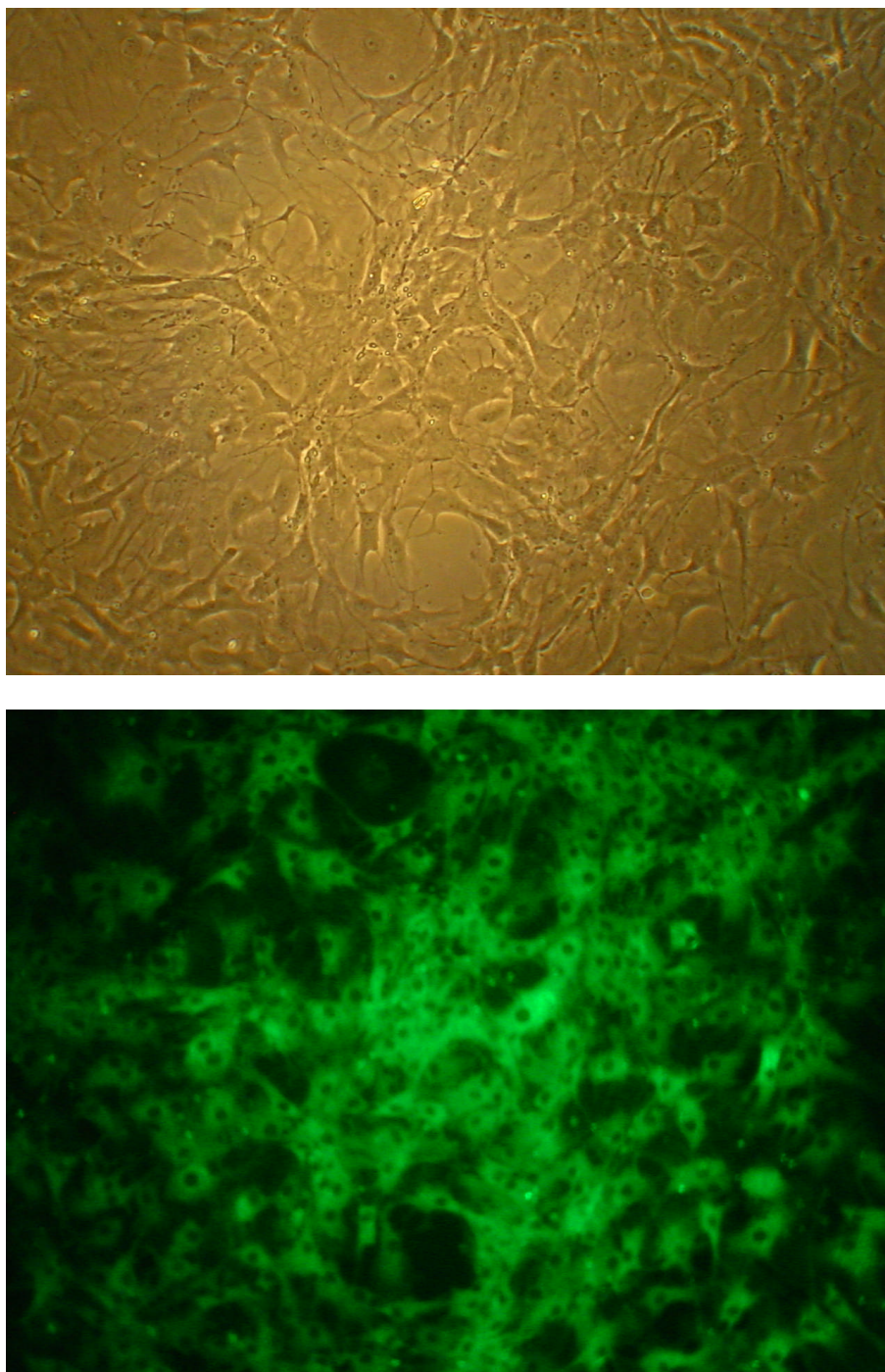


Figura 13. Cultivo de células madre mesenquimales cop-GFP positivas.

Cultivo de células madre adultas de tejido adiposo de rata cop-GFP positivas. La imagen superior corresponde a células madre en cultivo vistas en campo claro (50 x). La imagen inferior muestra el mismo campo con microscopio de fluorescencia (50 x).

Método de carga celular de las suturas

La carga de las células en los hilos de polyglactin 910 se realiza 30 horas antes de su utilización (Figuras 14 y 15). Se preparan 3 suturas de 30 cm por cada rata del grupo de biosuturas, ya que sólo se dan 1 ó 2 puntos con cada hilo cargado con células madre. Dado que cada hilo se tapiza con $1,5 \times 10^6$ de células madre, como se verá a continuación, y que se usan tres hilos por anastomosis, sabemos que en cada anastomosis aportamos, como máximo, aproximadamente $4,5 \times 10^6$ de células madre.

Protocolo de carga celular sobre los hilos de sutura:

- Prehidratación con 3 ml de PBS de pocillos de placas p6 ULA (*ultra low adhesion*, Costar) durante 1 hora a 37°C.
- Corte de los hilos de sutura de Polyglactin-910 para que tuvieran una longitud final de 30 cm.
- Eliminación del PBS de los pocillos y adición de 2 ml de medio de cultivo por pocillo para prehumedecer los hilos de sutura antes de ser cargados con las células.
- Preparación de la suspensión celular a razón de 750.000 cels/ml en un volumen de 2 ml de medio de cultivo. Retirar el medio que ha prehumedecido los hilos y añadir 2 ml de la suspensión celular por cada hilo de sutura a preparar.
- Finalmente introducir la placa en el incubador a 37°C con 5% CO₂ y colocar las placas sobre una plataforma oscilante que se mantiene balanceante de manera suave durante 24 horas.
- Transcurrido el tiempo de incubación, retirar el medio de cultivo (junto con las células que no se hayan adherido a las biosuturas) y añadir medio de cultivo fresco. Mantener en el incubador a 37°C con 5% CO₂ hasta el momento de su utilización.

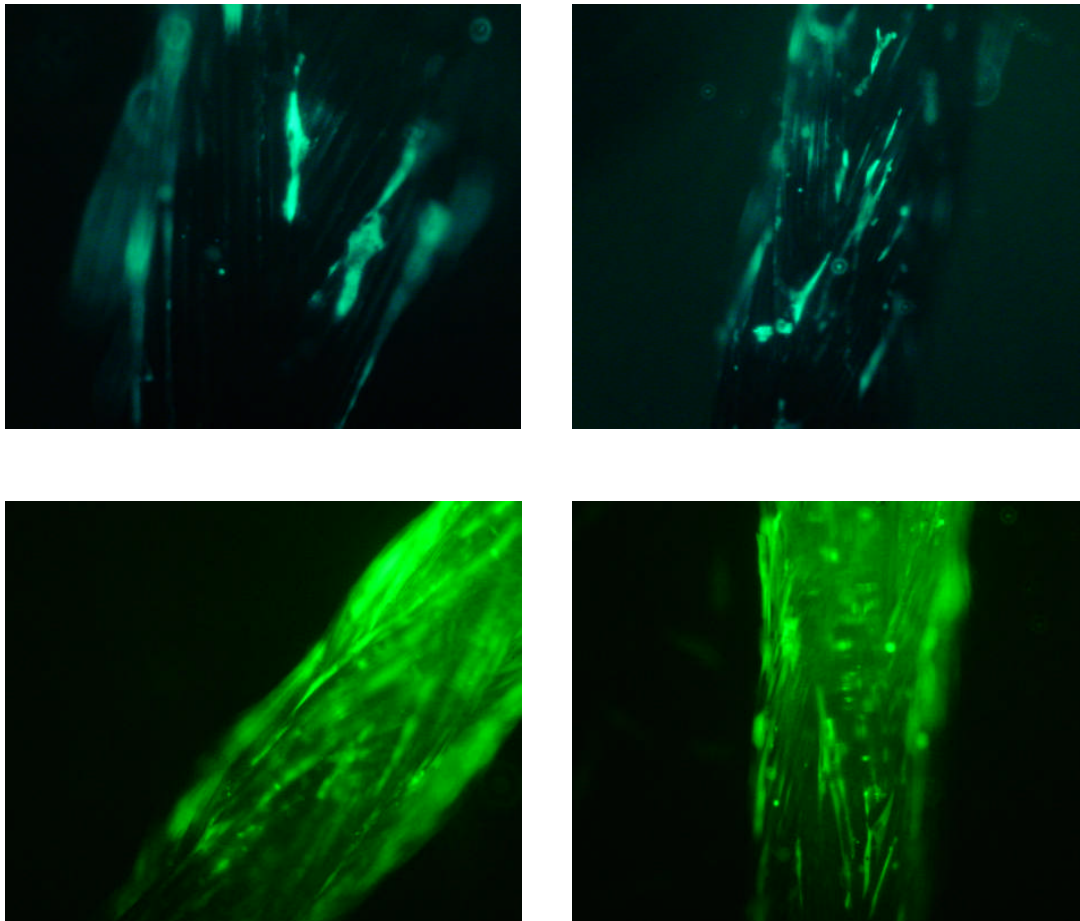


Figura 14. Proceso de carga del Polyglactin-910 con células madre adultas de tejido adiposo cop-GFP positivas (microscopio de fluorescencia 50 x).

El proceso de carga de células madre en los hilos con la utilización de placas de baja adhesión sobre plataforma oscilante es de 30 horas.

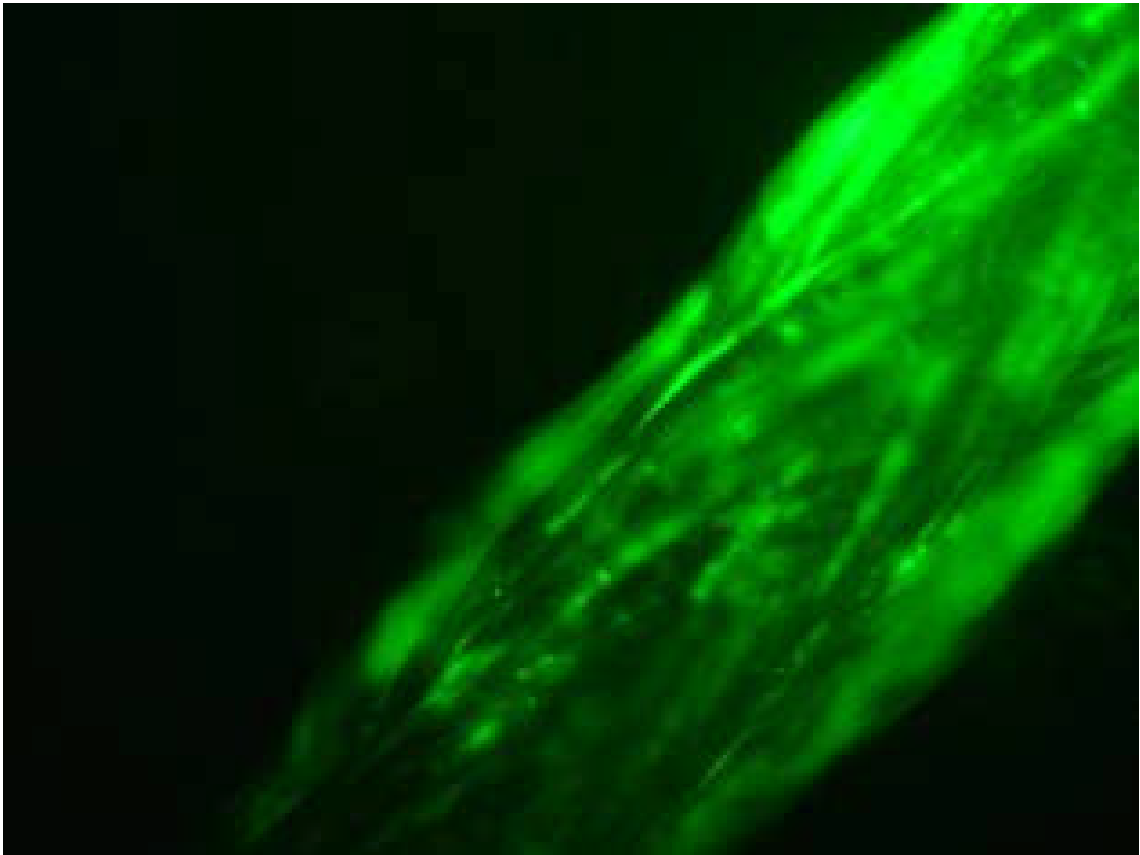


Figura 15. Sutura con células madre adultas de tejido adiposo cop-GFP positivas (microscopio de fluorescencia 50 x).

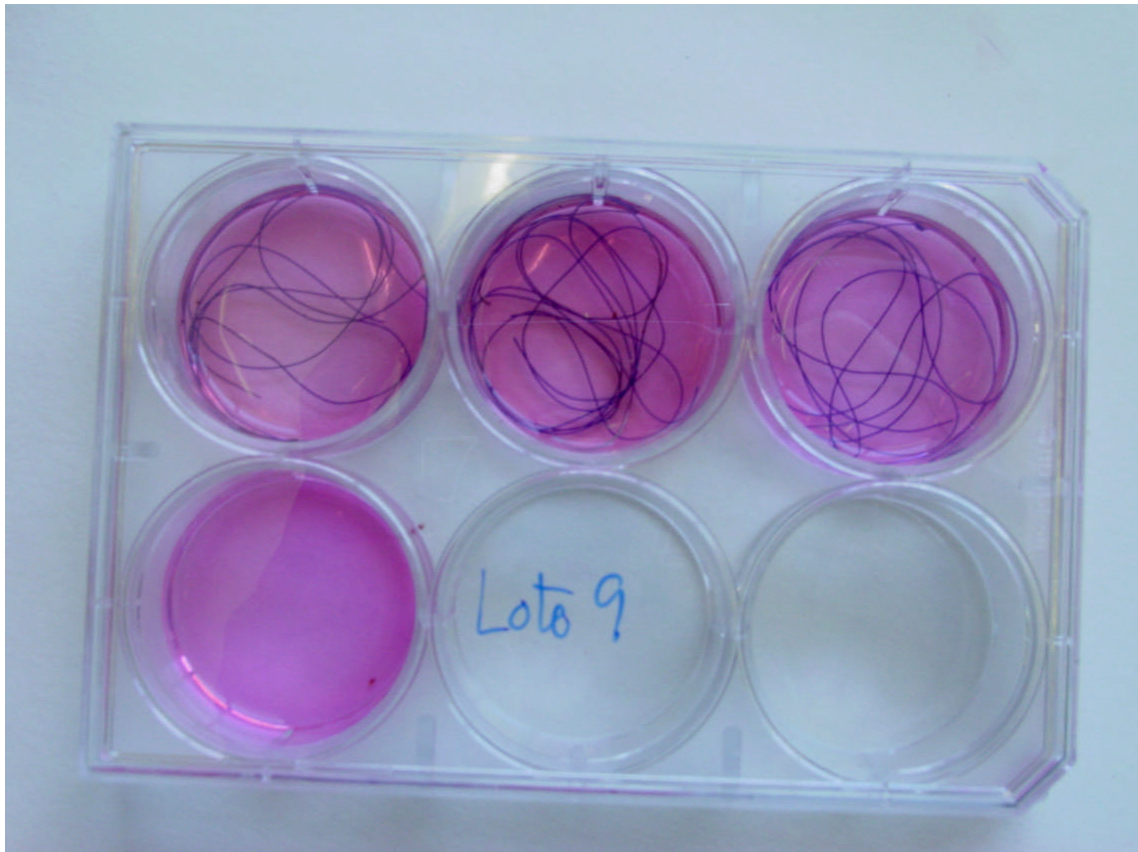


Figura 16. Aspecto macroscópico de los hilos recubiertos de células madre.

Por cada rata se preparan 3 unidades de polyglactin 910 de 4/0, que es lo que denominamos un lote (Figura 16). La mitad de los lotes se cultivan con células madre y la otra mitad se deja simplemente en el medio de cultivo de las células pero sin ellas. Con esto conseguimos que todos los hilos tengan el mismo aspecto en el momento de la cirugía y el cirujano no sepa distinguir los hilos convencionales de las biosuturas (ensayo ciego).

Método anestésico para la cirugía

Se prepara una solución con 2 ml de ketamina (Ketolar ®, vial 500 mg/10 ml), 0,4 ml de atropina (Atropina, ampolla 1 mg/ml) y 1,6 ml de diazepam (Valium ®, ampolla 10 mg/2 ml). Se inyecta en la cavidad peritoneal (cuadrante inferior izquierdo del abdomen del animal) con aguja de insulina la dosis adecuada al peso del animal (1 ml por 250 g de peso).

Método quirúrgico

Cada rata de cada grupo se identifica con un número del 1 al 10. A cada una le corresponde un lote de suturas para la anastomosis con el mismo número. El lote puede corresponder a tres hilos enriquecidos con células o no. Todos los hilos usados son aparentemente idénticos, de modo que el cirujano no puede saber con que tipo de hilo estaba trabajando.

Una vez anestesiada la rata, se rasura el abdomen y en decúbito supino se fijan las cuatro extremidades con esparadrapo a la mesa de la operación. Se lava el abdomen con clorhexidina y se delimita un campo quirúrgico con gasas.

Se realiza una laparotomía media de 3 a 5 cm de longitud. Una vez localizado el colon éste se extrae de la cavidad peritoneal y a 5 cm de la válvula ileocecal se secciona por completo (Figura 17). Si en algún caso se lesionan los vasos adyacentes al corte del colon se hace compresión hasta que cede la hemorragia. Entonces se procede a la anastomosis cólica término-terminal monopiano con polyglactin 910 4/0 con seis puntos sueltos: el primero en el borde antimesentérico, el segundo en el borde mesentérico y dos más entre ellos por cada lado (Figura 18). Una vez finalizada la anastomosis se reintroduce el colon en la cavidad abdominal.



Figura 17. Método quirúrgico: laparotomía, extracción del colon y sección.

Laparotomía media, extracción del colon de la cavidad abdominal y sección completa del mismo a 5 cm de la válvula ileocecal.

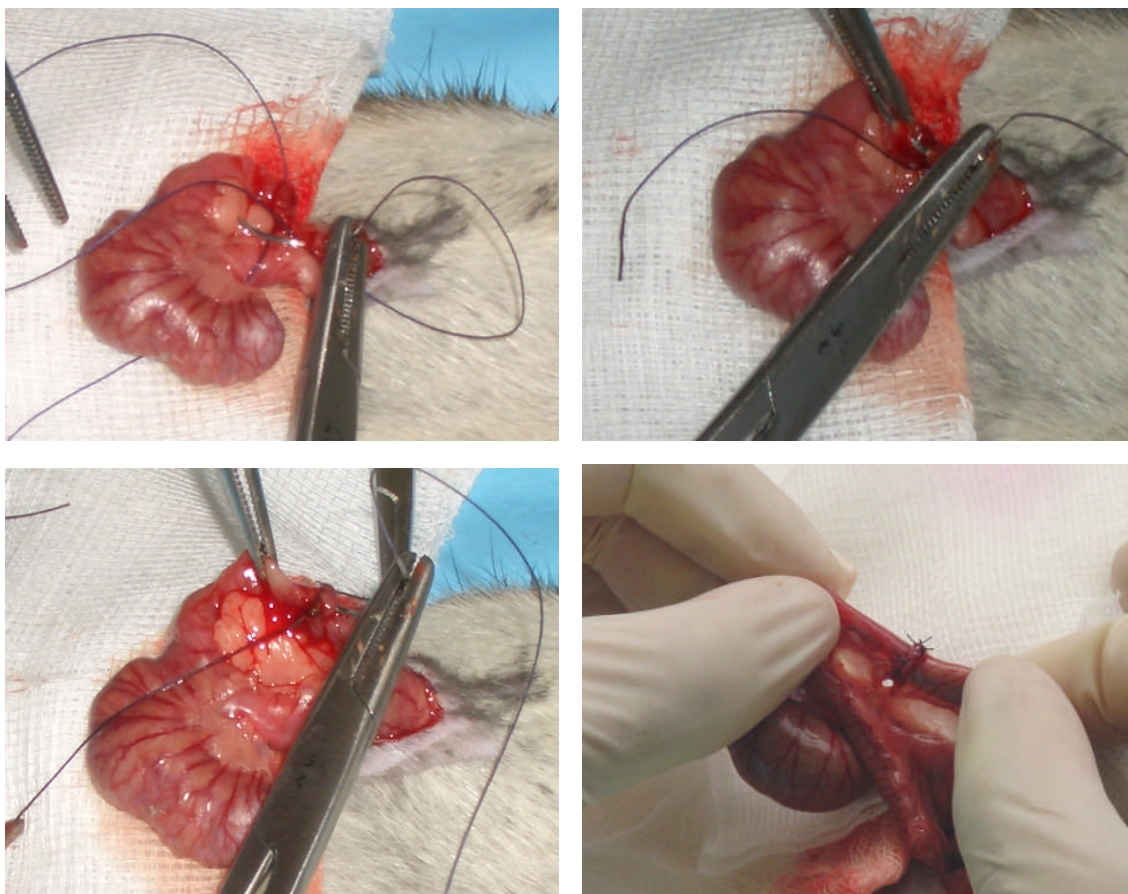


Figura 18. Método quirúrgico: anastomosis.

Anastomosis colo-cólica término-terminal monopiano con seis puntos sueltos de biosuturas o Polyglactin 910.

En el modelo 1 de anastomosis críticas, para evitar la formación de adherencias, la anastomosis se recubre con una lámina de látex de aproximadamente 1,5 cm de ancho por 2,5 cm de largo. Ésta se fija con un punto a cada cara del meso cólico.

Para cerrar la laparotomía en todos los casos se usó seda del 0 en dos planos. Primero se da una sutura continua del plano muscular abierto por la línea alba y a continuación la piel se cierra con puntos sueltos. Se lava el abdomen de nuevo con clorhexidina y se devuelve el animal a su jaula (Figura 19).

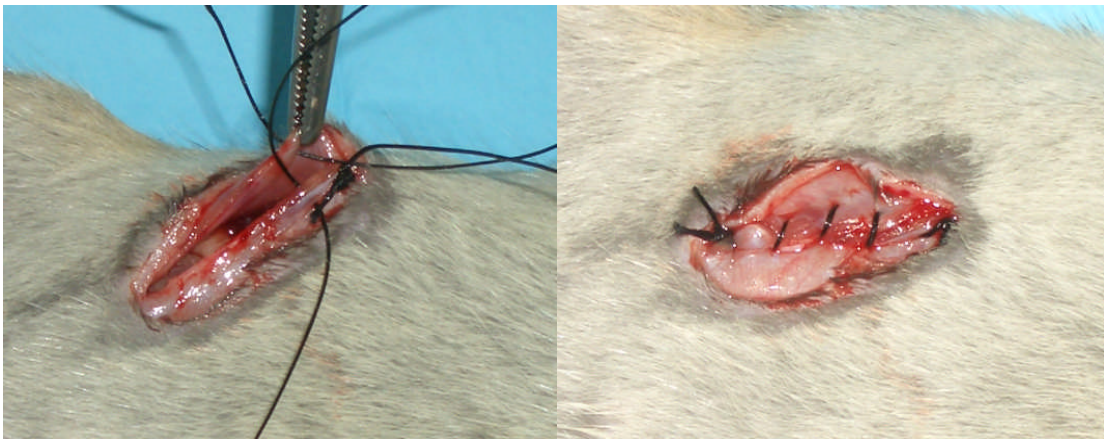


Figura 19. Método quirúrgico: cierre de la laparotomía.

En el caso de las anastomosis críticas para introducir la icodextrina en el abdomen, tras el cierre de la capa muscular del abdomen con la sutura continua con seda del 0, se introduce un catéter de perfusión intravenosa de 16 French a través de la incisión recién cerrada. Con una jeringa de 10 ml se introducen por el catéter 40 ml de icodextrina al 4%. Posteriormente se retira el catéter, se comprueba la estanqueidad de la pared abdominal y se cierra la piel con sutura continua con seda del 0.

Medida de las variables

Una vez sacrificado el animal por decapitación se abre el abdomen con una incisión en V, que permite visualizar toda la cavidad peritoneal, y se evalúan las variables que se citan a continuación. Cada una se valora al menos por dos observadores.

1. Dehiscencia clínica: si existe contenido cólico en el abdomen.
2. Dilatación: se considera como positivo si el diámetro del colon preanastomótico es doble que el postanastomótico.
3. Obstrucción: es positivo si existe dilatación y además no hay contenido fecal en el colon distal a la anastomosis.
4. Adherencias generales: se establecen cuatro grados: 0 (no había adherencias), 1 (adherencias locales), 2 (adherencias locoregionales) y 3 (adherencias difusas).
5. Grado de separación de las adherencias: se clasifican según la facilidad con la que se separaban: 1(fácil, por tracción), 2(moderado, cuando se pueden separar con instrumental romo) y 3(difícil, cuando es necesario corte para la disección).
6. Adherencias a la anastomosis: una vez separadas todas las adherencias lejanas a la anastomosis se secciona el colon a tres centímetros de la anastomosis y se secciona también el ileon para extraer en bloque toda la pieza. Una vez fuera de la cavidad abdominal se evalúa el porcentaje de la línea anastomótica cubierta por adherencias y se clasifica en cuatro categorías: 1 (0-25%), 2 (25-75%), 3 (75-100%) y 4 (100%).
7. Estructuras adheridas: 1 (epiplon), 2 (intestino delgado), 3 (colon) y 4 (otras).
8. Índice de adherencias: se calcula un índice que incluye las variables 4, 5 y 7 de la siguiente manera:

Índice de adherencias = grado de adherencias generales + grado de separación de adherencias + número de estructuras adheridas.

Este valor, que aúna mejor la calidad y cantidad de adherencias, es el que se compara entre los dos grupos, el de anastomosis hechas con biosuturas y el de anastomosis con hilos simples.

9. Presión de ruptura: una vez extraído el colon de la cavidad abdominal el ileon terminal se liga con seda del 1. El extremo del colon postanastomótico se liga con seda del 1 dejando en su interior un catéter de perfusión intravenosa de 16 French. Al anudar se deja la guía metálica para que no se colapse la luz, pero ligeramente retirada para no perforar la pieza (Figura 20).

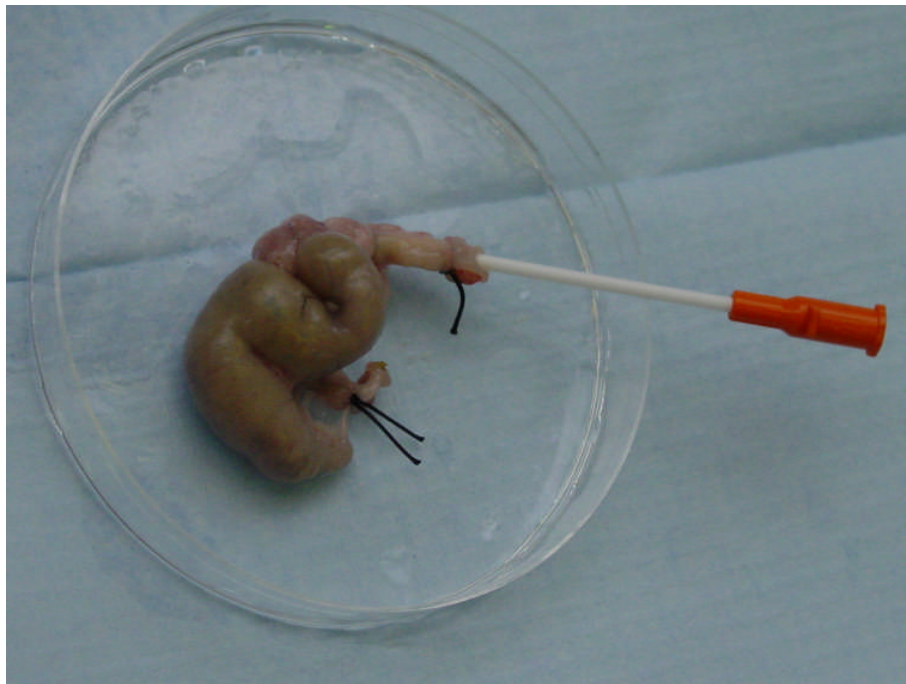


Figura 20. Preparación de la anastomosis para la medida de la presión de ruptura.

En el catéter se coloca una llave de tres pasos que a su vez se conecta al equipo de manometría y a una bomba de infusión de suero con azul de metileno (Figura 21).

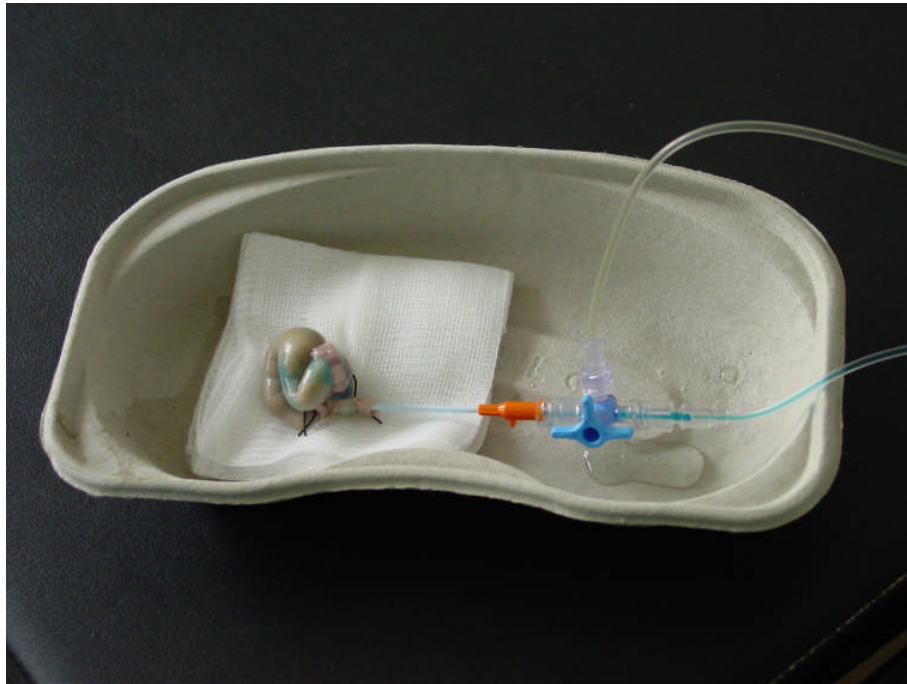


Figura 21. Conexión de la pieza a la llave de tres pasos.

En la bomba de infusión se coloca una jeringa de 50 ml con suero y azul de metileno que se programa a 99 ml/h una vez purgado el sistema.

Un canal del equipo de manometría purgado se conecta a la llave de tres pasos para medir la presión que va alcanzando el interior del colon conforme se inyecta el suero teñido. Antes de conectar cada pieza se establece el cero de presión en la presión atmosférica.

A continuación comienza la infusión de suero con azul de metileno a 99 ml/h en el interior del colon. La curva ascendente de presión se registra en el ordenador y se considera como presión de ruptura la máxima antes de la dehiscencia de la anastomosis o la ruptura del colon, momento en el cual la gasa se tiñe de azul (Figura 22).



Figura 22. Ruptura de la anastomosis. Impregnación de la gasa con azul de metileno.

En los animales en los que la anastomosis es dehiscente de forma macroscópica se considera que la presión de ruptura es 5 mm Hg.

10. Punto de ruptura: antes, después o en la anastomosis.

Cuando el punto de ruptura es la anastomosis se considera también el patrón gráfico de ruptura, según la evolución de la curva de presión tras la dehiscencia de la anastomosis.

Se distinguen dos patrones gráficos de ruptura, según la evolución de la gráfica de presión tras la ruptura:

- Patrón de estallido: se aprecia una elevación progresiva de la presión hasta la ruptura por un punto de la línea anastomótica, momento en que se observa una caída brusca de la presión. (Figura 23).



Figura 23. Patrón de estallido.

- Patrón de fuga: tras la ruptura por un punto de la línea anastomótica se produce una caída suave de presión. (Figura 24).

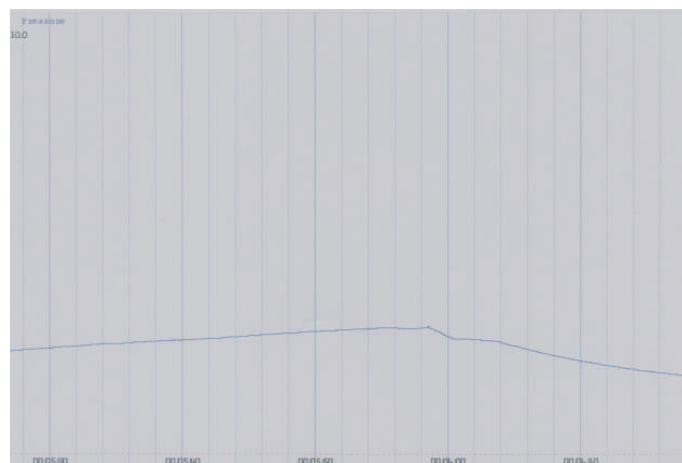


Figura 24. Patrón de fuga.

11. Radio de la anastomosis: tras la medida de la presión de ruptura, cada pieza de la que se va a estudiar histología se mantiene en formol y al quinto día se secciona con un bisturí de forma perpendicular a la línea anastomótica. El colon se abre y se mide la longitud de la anastomosis. Con todas las piezas de las anastomosis cólicas estándar se calcula así el radio de la circunferencia que forma la línea anastomótica. En las anastomosis críticas la medición de la línea anastomótica se lleva a cabo con el colon sin fijar. En los animales en los que la anastomosis es dehiscente de forma macroscópica se considera como radio de la anastomosis la media de los radios de su grupo.

12. Tensión de ruptura de la pared: esta variable se calcula con la Ley de Laplace: $TRP = 1,33 \times 10^3 \times PR \times r$ (dinas/cm), donde PR es la presión de ruptura (mm Hg) y r el radio de la circunferencia anastomótica (cm).

13. Examen histológico: se estudian cortes histológicos de cada anastomosis teñidos con hematoxilina-eosina.

Se selecciona toda la circunferencia intestinal a nivel de la anastomosis y se realizan secciones perpendiculares a la línea anastomótica. El tejido se fija en formol, si no lo está ya, y tras deshidratarlo y desgrasarlo se incluye en parafina. Los cortes histológicos se desparafinan y se tiñen con hematoxilina-eosina.

Se valora la intensidad de la inflamación en la anastomosis (leve, moderada o intensa), la presencia y cantidad de granulomas (no había, escasos o abundantes) y la presencia de fibrosis cicatricial. El examen histológico se lleva a cabo sin saber a que grupo pertenecía la anastomosis analizada.

14. Identificación de células GFP positivas: se analizan las muestras de anastomosis cólicas simples mediante microscopía de luz ultravioleta para tratar de identificar células GFP positivas.

4. Diseño experimental

Se plantea un experimento en dos etapas. En la primera se estudian las biosuturas en anastomosis cólicas estándar y en la segunda, anastomosis cólicas críticas.

Modelo de anastomosis cólica simple

En este grupo se comprueba la calidad de las anastomosis cólicas realizadas con biosuturas frente a las anastomosis con hilos convencionales según el modelo descrito anteriormente a diferentes días del postoperatorio. Para ello se establecen cuatro grupos de diez animales. En cada grupo, cinco ejemplares se operan con biosuturas y cinco con hilos control. En ningún momento, ni durante la cirugía ni durante la evaluación de variables, el cirujano sabe con que tipo de sutura está trabajando. Cada grupo de diez animales se sacrifica a un día del postoperatorio: 4º día, 7º día, 14º día y 21º día.

Modelos de anastomosis cólica crítica

Llamamos anastomosis crítica a aquella que cicatriza en un entorno sin adherencias. Para evitar las adherencias de las anastomosis intraperitoneales se establecen dos modelos. En el primero se recubre la anastomosis cólica con una lámina de látex. En este modelo se usan biosuturas en la mitad de los animales y suturas convencionales en la otra mitad (modelo 1). En el segundo modelo se utiliza icodextrina al 4% para evitar las adherencias peritoneales, y se realiza en dos etapas: en la primera se comparan las anastomosis sin adherencias por icodextrina con las anastomosis sin icodextrina. En una segunda etapa se comparan las anastomosis con biosuturas e icodextrina con las anastomosis con icodextrina (modelo 2).

Modelo 1: recubrimiento de la anastomosis con lámina de látex

Se operan 19 ratas BDIX según el modelo descrito anteriormente. En 10 ratas se usan biosuturas (polyglactin 910 de 4/0 recubierto de células madre) para realizar la anastomosis cólica y en las otras 9 polyglactin 910 de 4/0 sin modificar. Para obtener un modelo de anastomosis cólicas libre de adherencias, una vez finalizada la anastomosis ésta se recubre con una lámina de látex de aproximadamente 1,5 cm de ancho por 2,5 cm de largo que se fija con un punto en cada cara del meso del colon. El tipo de hilo utilizado para la fijación de la lámina es el mismo que se usa para la anastomosis en cada caso. De esta forma el látex protege por completo la zona de sutura (Figura 25).

Todas las ratas se sacrifican al cuarto día postoperatorio y se miden las variables de la 1 a la 12.

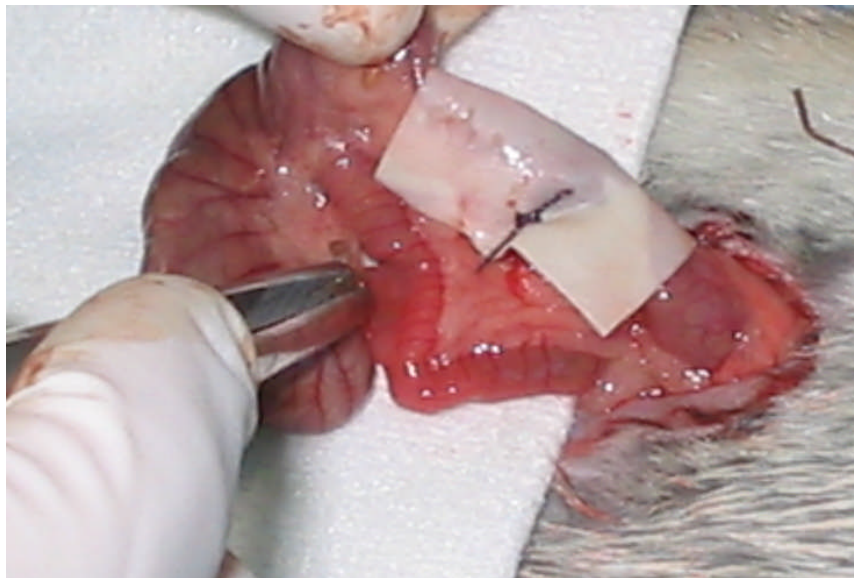


Figura 25. Anastomosis crítica mediante la colocación de lámina de látex.

Modelo 2: anastomosis en icodextrina 4%

Modelo 2.1

Con la técnica anestésica y quirúrgica descrita anteriormente se realiza una sutura colo-cólica con polyglactin 910 de 4/0 convencional en 10 ratas Sprague-Dawley. Como en este modelo no se usan biosuturas no es necesario utilizar animales singénicos. El primer subgrupo corresponde a anastomosis colo-cólicas que denominamos críticas, porque se dejan en icodextrina 4% intraperitoneal para disminuir las adherencias (Figura 26). En el segundo subgrupo las anastomosis se realizan con la misma técnica, pero no se añade la icodextrina (anastomosis control).

Las 10 ratas, todas operadas con suturas convencionales, se sacrifican al cuarto día postoperatorio y se evalúan las variables 1-12.



Figura 26. Inyección de la icodextrina.

Modelo 2.2

En una segunda etapa se operan 22 ratas BDIX en las que se realiza una anastomosis cólica crítica (en un ambiente sin adherencias). En once de los ejemplares se usan biosuturas y en las otras once ratas hilos convencionales (polyglactin 910).

Bajo la anestesia peritoneal anteriormente descrita y con la rata en decúbito supino, se hace una laparotomía media, extracción del colon de la cavidad abdominal y sección cólica a 5 cm de la válvula ileocecal. A continuación se anastomosa el colon en monoplano con seis puntos sueltos. En la mitad de los ejemplares los hilos tienen células madre y en la otra mitad no. Como siempre, el aspecto de los dos tipos de hilo es el mismo ya que los hilos convencionales también se mantienen en medio de cultivo con el fin de que el cirujano no sepa qué tipo de sutura está usando.

El cierre de la laparotomía se lleva a cabo con una sutura continua con seda del 0. Para introducir la icodextrina 4% en la cavidad peritoneal se inserta un catéter de perfusión intravenosa de 16 French en la laparotomía ya cerrada y se inyectan con una jeringa 40 ml de este líquido. El cierre de la piel se realiza mediante una sutura continua del 0 tras retirar el catéter.

5. Método estadístico

Se utiliza el test de Chi cuadrado para comparar las variables dehiscencia, dilatación, obstrucción, inflamación, granulomas y fibrosis. Para comparar el índice de adherencias, la presión de ruptura, el radio y la tensión de ruptura se usa el test U de Mann-Whitney. Un valor de p menor de 0,05 se considera estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Anastomosis cólicas estándar

Las cuarenta ratas fueron operadas de acuerdo con el protocolo establecido. La evaluación de todas las variables se realizó sin saber con qué tipo de hilos se había suturado la anastomosis (estudio ciego).

Grupo 4º día postanastomosis estándar (Tabla 4)

Una de las ratas se excluyó al cuarto día de la cirugía, en el momento del sacrificio, porque durante la operación se desgarró el mesosigma, sangró abundantemente y el postoperatorio fue más tórpido que el de las demás (rata 8). Otra se excluyó en el momento de preparar la pieza para medir la presión de ruptura, ya que se perforó la anastomosis al introducir el catéter (rata 9). En los ejemplares 1, 4, 6 y 7 se usaron hilos tapizados con células y en los restantes (2, 3, 5 y 10) hilos convencionales.

1. Dehiscencia: en ninguno de los casos hubo dehiscencia evidente de la sutura. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.
2. Dilatación: hubo tres casos en cada grupo que presentaron dilatación cólica. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.
3. Obstrucción: no se observó en ningún caso del grupo de biosuturas y sí en dos casos del grupo de suturas convencionales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 0,429).
4. Adherencias generales: en un caso del grupo de suturas con células madre las adherencias fueron difusas (25%), las demás presentaron adherencias locoregionales. Por el contrario un caso del otro grupo tuvo adherencias locoregionales y el resto eran difusas (75%).

5. Separación de adherencias: en el grupo de anastomosis con biosuturas las adherencias se separaron con facilidad, por tracción, en tres casos y en uno fue difícil la separación, con corte (25%). En el otro grupo las adherencias necesitaron corte en todos los casos para su separación (100%).
6. Adherencias a la anastomosis: en todos los casos hubo 100% de adherencias a la línea anastomótica.
7. Estructuras adheridas: el número de estructuras adheridas fue siempre de dos en el grupo de anastomosis con células, predominando el epiplon y el intestino delgado en todos los casos. En el grupo de anastomosis convencionales en tres casos se adhirieron tres estructuras y en un caso cuatro (en todos el intestino delgado y el epiplon).
8. Índice de adherencias: la media del índice de adherencias en el grupo de suturas con células fue 5,75 (DS \pm 1,5) y en el otro grupo 9 (DS \pm 0,81). Sí que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 0,02).
9. Presión de ruptura: la media de la presión de ruptura en el grupo de anastomosis con suturas con células madre fue 46,15 mmHg (DS \pm 11,62) y en el grupo de suturas convencionales 44,73 mmHg (DS \pm 13,57). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 0,77).
10. Punto de ruptura: en todos los casos (de ambos grupos) al cuarto día postoperatorio la línea anastomótica fue el punto de ruptura.

En el grupo de anastomosis en las que había células hubo un patrón gráfico de ruptura de tipo estallido y tres de tipo fuga. En el grupo de anastomosis sin células hubo tres patrones de ruptura de tipo estallido y uno de tipo fuga.

11. Radio de la anastomosis: la media del radio de las anastomosis del primer grupo fue 0,30 cm (DS \pm 0,07) y del segundo 0,27 cm (DS \pm 0,05). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 0,46).

12. Tensión de ruptura: la media de las tensiones de ruptura en el grupo de anastomosis con biosuturas fue $18,21 \times 10^3$ dinas/cm ($DS \pm 3,63$) y $16,29 \times 10^3$ dinas/cm ($DS \pm 6,46$) en el otro grupo. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos (p 0,56).

13. Examen histológico: en el estudio histológico se vio a nivel de la anastomosis un infiltrado inflamatorio agudo en el que predominaban los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos. Alrededor de dicha zona había abundante tejido de granulación constituido por vasos neoformados, fibroblastos, macrófagos, células plasmáticas y eosinófilos. A nivel de la serosa se veía peritonitis visceral bacteriana. En ninguno de los casos se encontró reacción granulomatosa al hilo de sutura ni fibrosis cicatricial. En ambos grupos hubo dos casos de inflamación aguda moderada/intensa y dos casos de inflamación aguda intensa (Figura 27). En los casos 5, 6 y 10 se observó necrosis grasa de tipo enzimático. No hubo diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las tres variables analizadas.

14. Búsqueda de las células madre en las anastomosis

En las muestras de anastomosis cólicas estándar realizadas con biosuturas no se encontraron células GFP positivas.

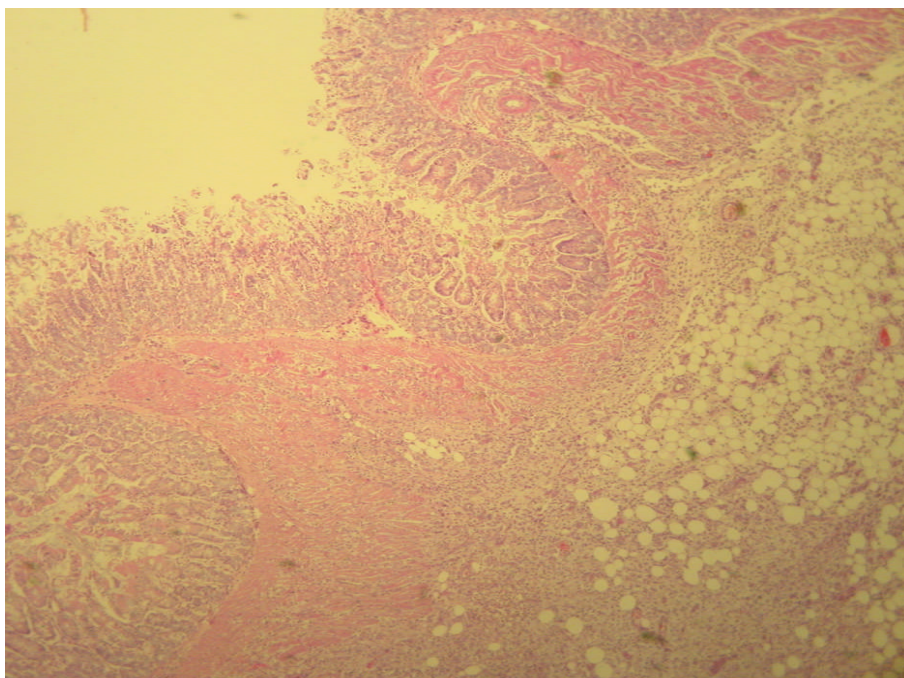


Figura 27. Estudio histológico de las anastomosis. (Hematoxilina – eosina 10 x).

Pared del colon correspondiente a una zona de anastomosis con inflamación aguda intensa.

4° día postanastomosis estándar

		INFLAMACIÓN		ADHERENCIAS				RESISTENCIA			HISTOLOGÍA		
	De	Di	Ob	AG	Se	EA	IA	PR	r	TR	Inflamación	Granulomas	Fibrosis cicatricial
Biosuturas	NO	NO	NO	2	1	1,3	5	43,1	0,38	21,78	Moderada/intensa	NO	NO
	NO	SI	NO	2	1	1,2	5	41,73	0,35	19,42	Moderada/intensa	NO	NO
	NO	SI	NO	2	1	2,4	5	63,1	0,22	18,46	Intensa	NO	NO
	NO	SI	NO	3	3	1,2	8	36,7	0,27	13,17	Intensa	NO	NO
MEDIA							5,75	46,15	0,30	18,21			
Control	NO	SI	SI	3	3	1,2,3,4	10	52	0,24	16,59	Moderada/intensa	NO	NO
	NO	SI	NO	2	3	1,2,3	8	50,47	0,35	23,49	Moderada/intensa	NO	NO
	NO	NO	NO	3	3	1,2,3	9	52,06	0,25	17,30	Intensa	NO	NO
	NO	SI	SI	3	3	1,2,4	9	24,4	0,24	7,78	Intensa	NO	NO
MEDIA							9	44,73	0,27	16,29			

Tabla 4. Resultados de las anastomosis estándar al cuarto día postoperatorio.

De: dehiscencia, Di: dilatación, Ob: obstrucción, AG: adherencias generales, Se: separación de adherencias, EA: estructuras adheridas, IA: índice de adherencias, PR: presión de ruptura (mm Hg), r: radio (cm), TR: tensión de ruptura ($\times 10^3$ dinas/cm).

Grupo 7º día postanastomosis estándar (Tabla 5)

En los ejemplares 2, 3, 6, 7 y 10 se utilizaron biosuturas y en los restantes (1, 4, 5, 8, 9) hilos convencionales.

1. Dehiscencia: en ningún caso se evidenció dehiscencia de la anastomosis. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.
2. Dilatación: ninguno de los casos tuvo dilatación cólica previa a la sutura. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.
3. Obstrucción: no se presentó ningún caso de obstrucción intestinal. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.
4. Adherencias generales: en todos los casos de anastomosis realizadas con hilos con células madre las adherencias fueron locoregionales (100%), en las anastomosis con hilos convencionales las adherencias fueron difusas en todos los casos menos en uno (20%).
5. Separación de adherencias: en cuatro casos de las anastomosis con células madre las adherencias se separaron fácilmente, con un instrumento romo (80% grado 2) y sólo en uno hubo que cortar para separarlas (20% grado 3). En todos los casos de anastomosis con hilos convencionales fue preciso el corte para separar las adherencias (100% grado 3).
6. Adherencias a la anastomosis: en todos los casos las adherencias cubrían por completo la línea anastomótica (grado 4 en el 100% de los casos de ambos grupos).
7. Estructuras adheridas: en todos los casos del primer grupo, con biosuturas, las estructuras adheridas fueron dos: epiplon e intestino delgado. En el grupo de hilos convencionales hubo dos casos de dos estructuras adheridas (epiplon e intestino delgado), dos casos de tres estructuras adheridas y un caso de cuatro estructuras adheridas.

8. Índice de adherencias: la media del índice de adherencias del grupo de hilos con células fue 6,2 (DS \pm 0,44) y en el otro grupo fue 8,6 (DS \pm 0,89). Sí que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 0,006).

9. Presión de ruptura: la media de la presión de ruptura en el grupo de anastomosis con suturas con células fue 123,53 mm Hg (DS \pm 10,98) y en el grupo de anastomosis con hilos simples fue 115,59 mm Hg (DS \pm 12,87). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos (p 0,209).

10. Punto de ruptura: hubo un ejemplar en cada grupo que fugó por la línea anastomótica: ejemplares 5 y 10 (20%). En el resto se produjo estallido del ciego (80%). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

El patrón gráfico de ruptura en los dos casos de ruptura por la línea anastomótica fue de fuga (Figura 28).



Figura 28. Patrón gráfico de ruptura tipo fuga.

Existe una disminución progresiva de la presión desde el momento de ruptura de la anastomosis.

11. Radio de la anastomosis: la media del radio de las anastomosis realizadas con hilos con células fue 0,35 cm ($DS \pm 0,03$) y la del grupo de anastomosis con hilos sin células 0,35 ($DS \pm 0,06$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 0,83).

12. Tensión de ruptura: la media del grupo de hilos con células fue $57,61 \times 10^3$ dinas/cm ($DS \pm 9,61$) y la media del segundo grupo $55,26 \times 10^3$ dinas/cm ($DS \pm 11,73$). No hubo diferencias estadísticamente significativas (p 0,75).

13. Examen histológico: en todos los casos de anastomosis de hilos con células madre la inflamación fue considerada como aguda intensa (100%). Entre las otras anastomosis se encontraron dos casos en que la inflamación era aguda intensa (40%), uno moderada/intensa (20%) y otros dos moderada (40%). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 0,117). En todos los casos se encontraron granulomas escasos, excepto en una anastomosis del grupo de hilos con células en que los granulomas fueron abundantes. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 1,0). En ningún ejemplar se observó fibrosis cicatricial.

14. Búsqueda de las células madre en las anastomosis

Mediante microscopía de luz ultravioleta no se encontraron en ningún caso células GFP positivas en los cortes histológicos de anastomosis cólicas estándar realizadas con biosuturas.

7º día postanastomosis estándar

		INFLAMACIÓN		ADHERENCIAS				RESISTENCIA			ANÁLISIS HISTOLÓGICO		
	De	Di	Ob	AG	Se	EA	IA	PR	r	TR	Inflamación	Granulomas	Fibrosis cicatricial
Biosuturas	NO	NO	NO	2	2	1,2	6	124	0,36	60,36	Aguda intensa	Escasos	NO
	NO	NO	NO	2	2	1,2	6	126,4	0,30	50,77	Aguda intensa	Abundantes	NO
	NO	NO	NO	2	2	1,2	6	138,54	0,39	73,33	Aguda intensa	Escasos	NO
	NO	NO	NO	2	3	1,2	7	120,73	0,31	51,06	Aguda intensa	Escasos	NO
	NO	NO	NO	2	2	1,2	6	108	0,36	52,57	Aguda intensa	Escasos	NO
MEDIA							6,2	123,53	0,35	57,61			
Control	NO	NO	NO	3	3	1,2,4	9	119,7	0,42	68,08	Aguda intensa	Escasos	NO
	NO	NO	NO	3	3	1,2	8	121,82	0,27	43,74	Aguda moderada	Escasos	NO
	NO	NO	NO	2	3	1,2,3	8	92,78	0,35	43,16	Aguda moderada	Escasos	NO
	NO	NO	NO	3	3	1,2	8	124	0,39	65,63	Aguda intensa	Escasos	NO
	NO	NO	NO	3	3	1,2,3,4	10	119,68	0,35	55,71	Aguda intensa/moderada	Escasos	NO
MEDIA							8,6	115,59	0,35	55,26			

Tabla 5. Resultados de las anastomosis estándar al séptimo día postoperatorio.

De: dehiscencia, Di: dilatación, Ob: obstrucción, AG: adherencias generales, Se: separación de adherencias, EA: estructuras adheridas, IA: índice de adherencias, PR: presión de ruptura (mm Hg), r: radio (cm), TR: tensión de ruptura ($\times 10^3$ dinas/cm).

Grupo 14° día postanastomosis estándar (Tabla 6)

Los animales 1, 4, 6, 7 y 9 fueron operados usando biosuturas y los animales 2, 3, 5, 8 y 10 se operaron con hilos convencionales.

1. Dehiscencia: en ningún ejemplar se observó dehiscencia de la sutura. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.
2. Dilatación: en cada grupo hubo tres ejemplares en los que existía dilatación del colon preanastomótico, por lo tanto no hubo diferencias significativas entre los dos grupos.
3. Obstrucción: en ninguno de los casos hubo obstrucción y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.
4. Adherencias generales: las adherencias fueron locales en tres ejemplares del grupo de anastomosis con hilos con células madre (60% grado 1), en los otros dos las adherencias eran locoregionales (40% grado 2). En el segundo grupo un ejemplar tuvo adherencias difusas (20% grado 3), tres ejemplares adherencias locoregionales (60% grado 2) y uno locales (20% grado 1).
5. Separación de adherencias: la separación de las adherencias tuvo la misma dificultad en los dos grupos: cuatro ejemplares precisaron corte para la separación (80% grado 3) y uno precisó instrumental romo (20% grado 2).
6. Adherencias a la anastomosis: en un caso con biosuturas la anastomosis estuvo recubierta en grado 3. Todos los demás casos presentaron 100% (grado 4) de recubrimiento por adherencias de la línea anastomótica.
7. Estructuras adheridas: en tres casos de las anastomosis con células madre la única estructura adherida fue el epiplon, y en los otros dos además del epiplon estaba adherido también el intestino delgado. En el segundo grupo en tan sólo un caso había una estructura adherida (epiplon), en los otros cuatro ejemplares había dos estructuras adheridas (intestino delgado en tres y colon en la cuarta)

8. Índice de adherencias: la media del índice de adherencias en el grupo de anastomosis con hilos con células fue 5,60 (DS \pm 1,34) y en el otro grupo 6,60 (DS \pm 1,51). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos (p 0,26).
9. Presión de ruptura: la media de la presión de ruptura en el grupo de anastomosis con hilos con células fue 96,44 mm Hg (DS \pm 13,77) y en el grupo de hilos normales 101,74 mm Hg (DS \pm 8,9). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 0,53).
10. Punto de ruptura: en todos los ejemplares la infusión de suero provocó el estallido del ciego, sin que ninguna de las suturas fugara antes de este momento.
11. Radio de la anastomosis: la media del radio de las anastomosis del primer grupo fue 0,30 cm (DS \pm 0,06) y la del otro grupo 0,24 cm (DS \pm 0,08). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambas (p 0,24).
12. Tensión de ruptura: la media en el grupo de anastomosis en que había células madre fue $39,35 \times 10^3$ dinas/cm (DS \pm 7,88) y en el otro grupo $33,78 \times 10^3$ dinas/cm (DS \pm 13,24). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 0,46).
13. Examen histológico: en todos los ejemplares la inflamación encontrada fue de tipo crónico. En un caso de las anastomosis hechas con biosuturas la inflamación fue leve (20%) (Figura 29), en tres casos fue moderada (60%) y en un caso intensa (20%). En todos los casos de las anastomosis realizadas con hilos convencionales la inflamación fue moderada (100%). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 0,287). Los granulomas encontrados fueron escasos en dos ejemplares (40%) del grupo de anastomosis hechas con células y abundantes en tres (60%). En el segundo grupo se encontraron los mismos hallazgos, por lo tanto no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 1).

14. Búsqueda de las células madre en las anastomosis

No se encontraron en ningún caso células GFP positivas en las muestras de anastomosis cólicas estándar realizadas con biosuturas.

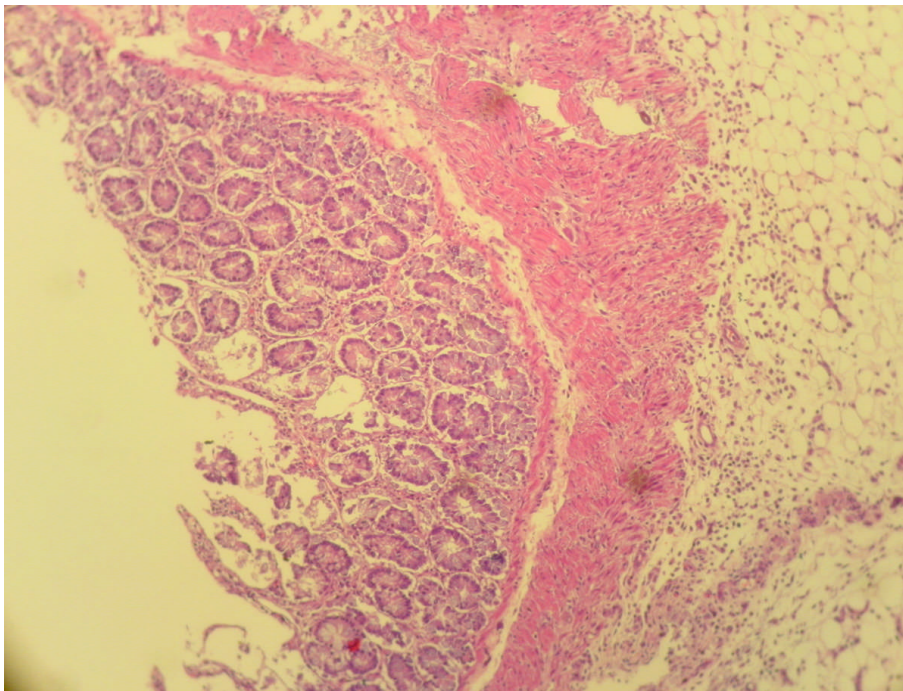


Figura 29. Estudio histológico de las anastomosis. (Hematoxilina – eosina 10 x).

Pared del colon correspondiente a una zona de anastomosis con inflamación leve.

14° día postanastomosis estándar

		INFLAMACIÓN		ADHERENCIAS				RESISTENCIA			ANÁLISIS HISTOLÓGICO		
	De	Di	Ob	AG	Se	EA	IA	PR	r	TR	Inflamación	Granulomas	Fibrosis cicatricial
Biosuturas	NO	NO	NO	1	2	1	4	114,57	0,28	43,58	Crónica moderada	Abundantes	NO
	NO	SI	NO	2	3	1,2	7	80,2	0,36	39,04	Crónica moderada	Escasos	NO
	NO	SI	NO	1	3	1	5	87,62	0,22	25,97	Crónica intensa	Escasos	NO
	NO	NO	NO	1	3	1	5	105,6	0,30	42,41	Crónica leve	Abundantes	NO
	NO	SI	NO	2	3	1,2	7	94,21	0,36	45,86	Crónica moderada	Abundantes	NO
MEDIA							5,6	96,44	0,30	39,37			
Control	NO	SI	NO	2	3	1,2	7	101,21	0,19	25,71	Crónica moderada	Abundantes	NO
	NO	SI	NO	2	3	1,2	7	87,62	0,12	14,8	Crónica moderada	Escasos	NO
	NO	NO	NO	1	2	1	4	101,36	0,31	42,87	Crónica moderada	Abundantes	NO
	NO	NO	NO	2	3	1,2	7	110,63	0,31	46,79	Crónica moderada	Escasos	NO
	NO	SI	NO	3	3	1,4	8	107,92	0,27	38,75	Crónica moderada	Abundantes	NO
MEDIA							6,6	101,74	0,24	33,78			

Tabla 6. Resultados de las anastomosis estándar al décimocuarto día postoperatorio.

De: dehiscencia, Di: dilatación, Ob: obstrucción, AG: adherencias generales, Se: separación de adherencias, EA: estructuras adheridas, IA: índice de adherencias, PR: presión de ruptura (mm Hg), r: radio (cm), TR: tensión de ruptura ($\times 10^3$ dinas/cm).

Grupo 21° día postanastomosis estándar (Tabla 7)

A los ejemplares 1, 2, 4, 7 y 9 se les realizó una anastomosis colocólica con biosuturas y a los casos 3, 5, 6, 8 y 10 una anastomosis con suturas convencionales.

1. Dehiscencia: no hubo dehiscencia en ningún ejemplar analizado y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.
2. Dilatación: se encontró dilatación en tres casos en cada grupo, por lo que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.
3. Obstrucción: sólo en un caso del grupo de anastomosis hechas con hilos con células madre se hallaron datos de obstrucción. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p = 1$).
4. Adherencias generales: en tres casos las adherencias generales fueron locales (60%) y en dos locoregionales (40%) en el primer grupo. En el segundo las adherencias fueron locoregionales en cuatro ejemplares (80%) y difusas en uno (20%).
5. Separación de adherencias: en el grupo de suturas con células madre en dos ejemplares las adherencias se separaron por tracción (40% grado 1), en otros dos con instrumento romo (40% grado 2) y en uno con corte (20% grado 3). En el otro grupo un ejemplar presentó adherencias fáciles de separar (20% grado 1), dos adherencias moderadas (40% grado 2) y dos adherencias firmes (40%).
6. Adherencias a la anastomosis: en ambos grupos se encontraron los mismos hallazgos: dos ejemplares con grado 3 y tres ejemplares con grado 4, por lo tanto no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos.
7. Estructuras adheridas: en dos casos del primer grupo sólo estaba adherido el epiplon y en los otros tres estaba adherido también el intestino delgado. En el segundo grupo en cuatro casos estaba adherido el epiplon y en uno además el intestino delgado.

8. Índice de adherencias: en el primer grupo la media fue 4,80 (DS \pm 1,78) y en el segundo 5,60 (DS \pm 1,51). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos (p 0,52).
9. Presión de ruptura: la media de la presión de ruptura del primer grupo fue 104,48 mm Hg (DS \pm 15,53) y en el segundo 120,61 mm Hg (DS \pm 13,72). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos (p 0,17).
10. Punto de ruptura: en todos los casos el ciego fue el punto de ruptura.
11. Radio de la anastomosis: la media de los radios del grupo con células fue 0,30 cm (DS \pm 0,02) y la del segundo grupo 0,30 cm (DS \pm 0,05). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos (p 0,75).
12. Tensión de ruptura: la media del primer grupo fue $42,09 \times 10^3$ (DS \pm 4,5) y la del segundo $48,14 \times 10^3$ dinas/cm (DS \pm 7,9). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos (p 0,25).
13. Examen histológico: la inflamación fue leve en cuatro casos y moderada en uno del primer grupo y leve en tres casos y moderada en dos en el segundo. En todos fue de tipo crónico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos (p 1). Los granulomas encontrados en el primer grupo fueron escasos en dos ejemplares y abundantes en tres. En el segundo grupo hubo granulomas abundantes en todos los casos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos (p 0,444).
14. Búsqueda de las células madre en las anastomosis

Mediante microscopía de luz ultravioleta se analizaron muestras de anastomosis cólicas estándar con biosuturas para identificar las células madre. Se seleccionaron las zonas cercanas a las anastomosis y se evaluaron, pero no se encontraron en ningún caso células GFP positivas.

21° día postanastomosis estándar

		INFLAMACIÓN		ADHERENCIAS				RESISTENCIA			ANALISIS HISTOLOGICO		
	De	Di	Ob	AG	Se	EA	IA	PR	r	TR	Inflamación	Granulomas	Fibrosis cicatricial
Biosuturas	NO	SI	SI	2	2	1,2	6	92,3	0,33	41	Crónica leve	Escasos	SI
	NO	SI	NO	1	1	1	3	116,67	0,27	41,89	Crónica leve	Escasos	SI
	NO	NO	NO	1	2	1,2	5	124,2	0,28	47,24	Crónica leve	Abundantes	SI
	NO	NO	NO	1	1	1	3	101,19	0,33	44,95	Crónica leve	Abundantes	SI
	NO	SI	NO	2	3	1,2	7	88,07	0,30	35,37	Crónica moderada	Abundantes	SI
MEDIA							4,8	104,48	0,30	42,09			
Control	NO	NO	NO	2	1	1	4	109,35	0,30	43,92	Crónica leve	Abundantes	SI
	NO	SI	NO	3	3	1,2	8	117,72	0,38	59,8	Crónica leve	Abundantes	SI
	NO	SI	NO	2	2	1	5	109,9	0,31	46,48	Crónica moderada	Abundantes	SI
	NO	SI	NO	2	3	1	6	123,2	0,23	39,07	Crónica leve	Abundantes	SI
	NO	NO	NO	2	2	1	5	142,9	0,27	51,45	Crónica moderada	Abundantes	SI
MEDIA							5,6	120,61	0,30	48,14			

Tabla 7. Resultados de las anastomosis estándar al vigésimoprimer día postoperatorio.

De: dehiscencia, Di: dilatación, Ob: obstrucción, AG: adherencias generales, Se: separación de adherencias, EA: estructuras adheridas, IA: índice de adherencias, PR: presión de ruptura (mm Hg), r: radio (cm), TR: tensión de ruptura ($\times 10^3$ dinas/cm).

En estas dos tablas se muestra la evolución a lo largo del postoperatorio de las variables que miden resistencia (Figuras 30 y 31).

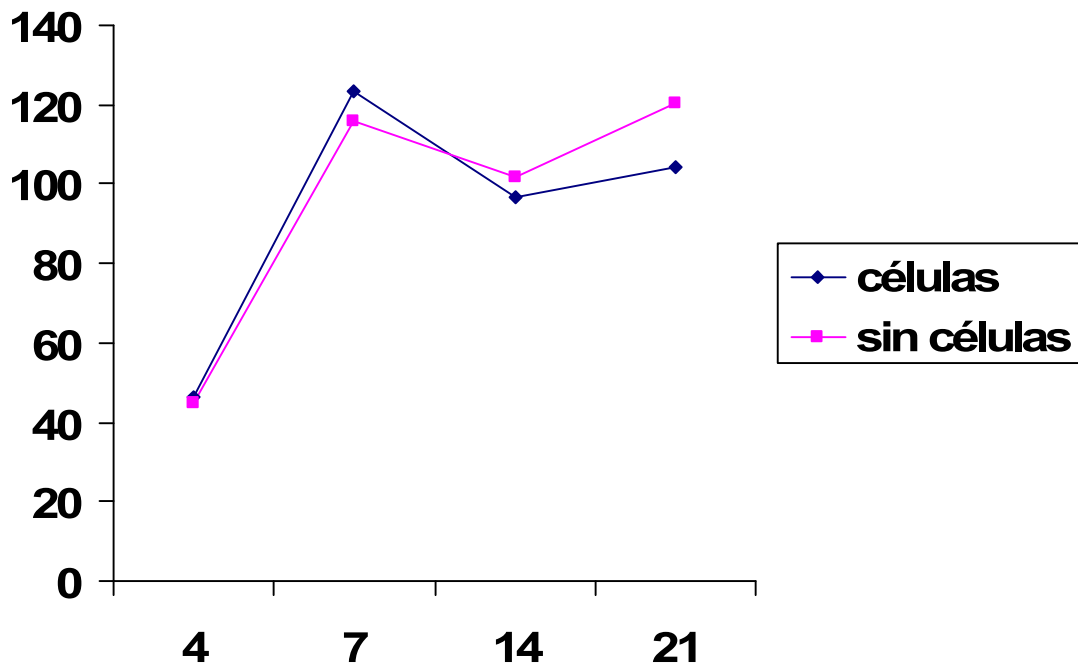


Figura 30. Evolución de la presión de ruptura a diferentes días. PR (mm Hg).

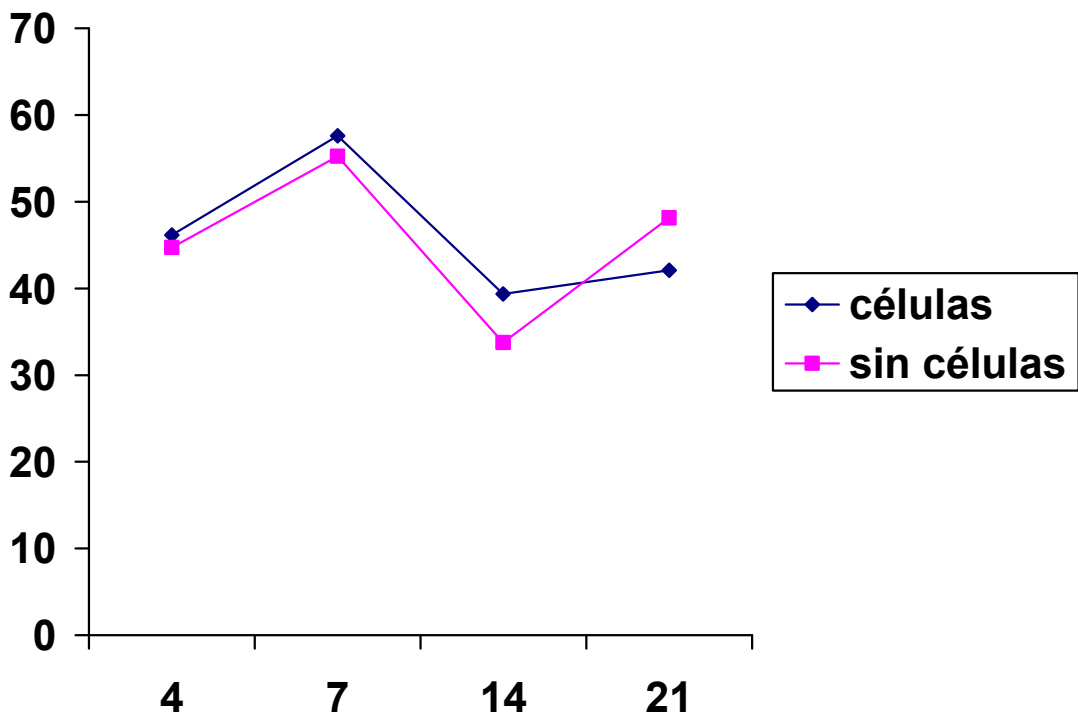
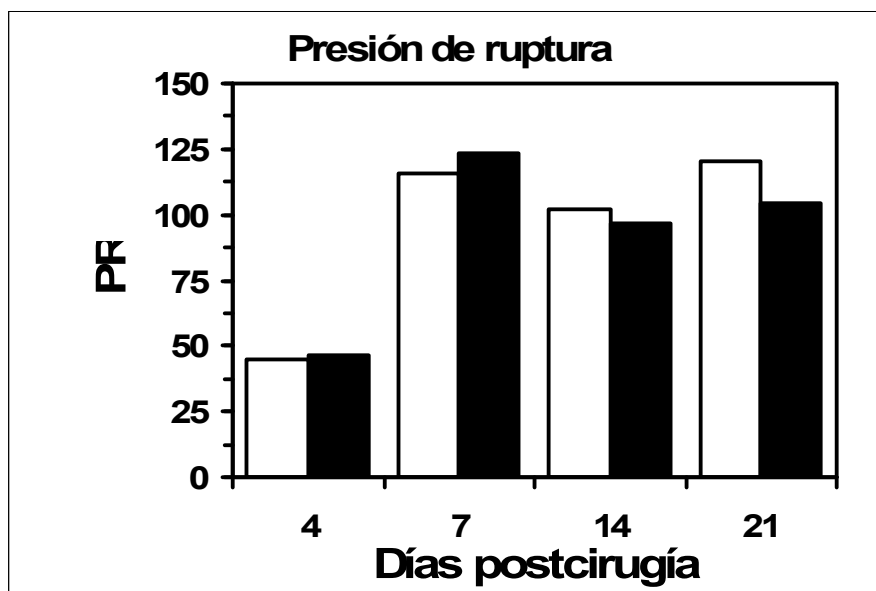
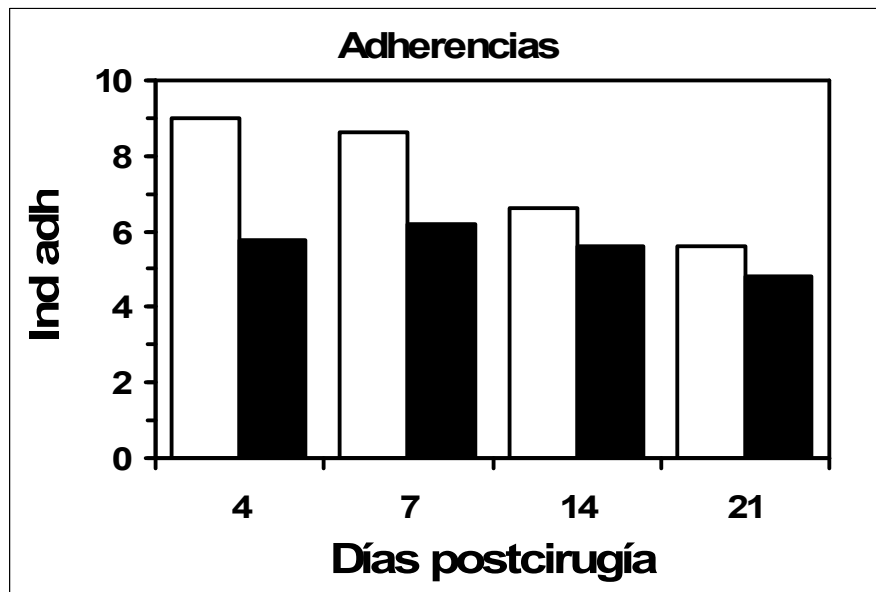
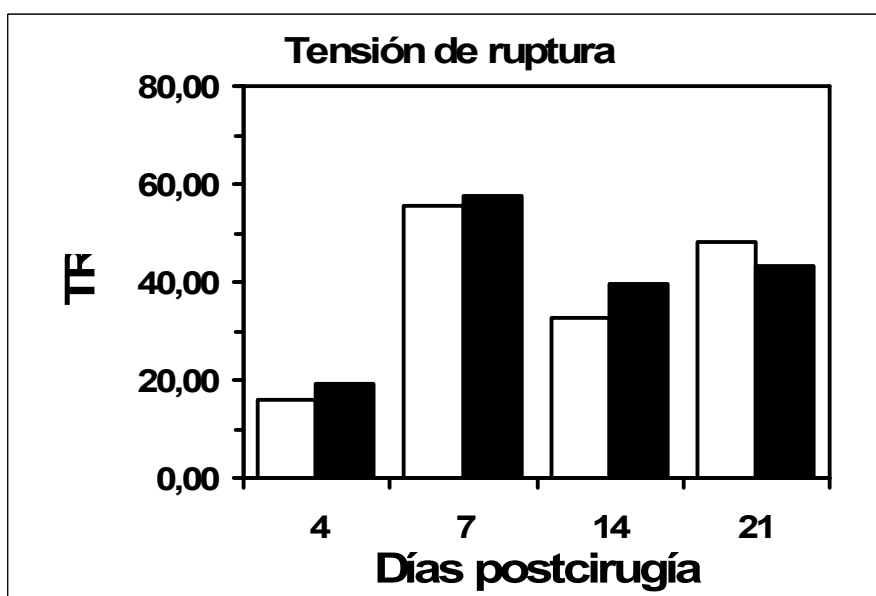
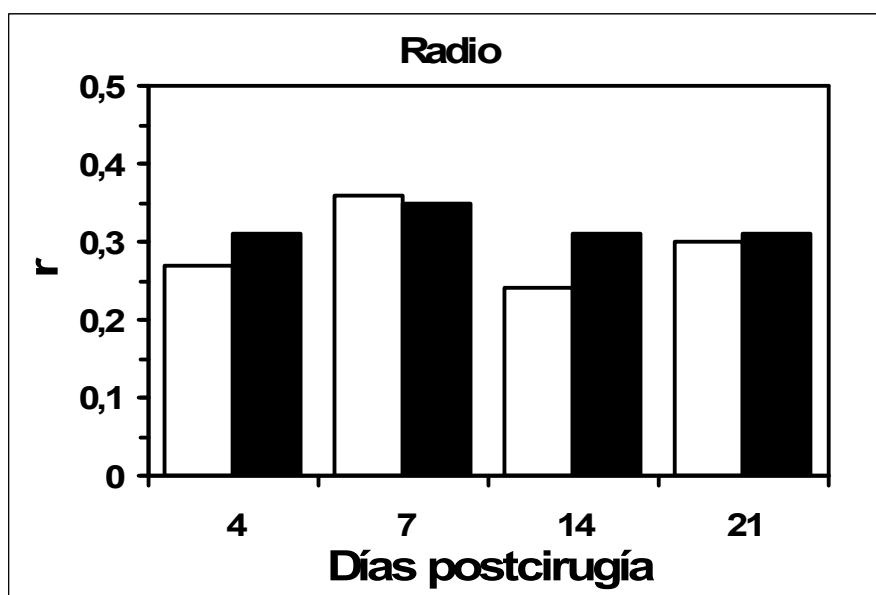


Figura 31. Evolución de la tensión de ruptura a diferentes días. TR (dinas/cm x 10³).



Figuras 32 y 33. Evolución del Índice de adherencias y la Presión de Ruptura (mm Hg) a diferentes días del postoperatorio.

Las columnas en blanco corresponden a los controles y las negras a las biosuturas.



Figuras 34 y 35. Evolución del radio (cm) y la Tensión de ruptura ($\text{dynes/cm} \times 10^3$) a diferentes días del postoperatorio.

Las columnas en blanco corresponden a los controles y las negras a las biosuturas.

Anastomosis cólicas críticas

Modelo 1: recubrimiento de la anastomosis con lámina de látex (Tabla 8)

De las 19 ratas intervenidas según el modelo establecido 6 fallecieron (ejemplares 1, 6, 7, 8, 9, 13) entre el primer día y el cuarto día postoperatorio (mortalidad 31,57 %). El análisis de los animales fallecidos no estableció que la dehiscencia de la anastomosis fuera la causa de la muerte. El resto fueron sacrificadas al cuarto día postoperatorio según el protocolo establecido: siete correspondían al grupo de hilos recubiertos con células madre (2, 3, 10, 11, 15, 16, 18) y seis al grupo de hilos convencionales (4, 5, 12, 14, 17, 19).

1. Dehiscencia: no se observó ningún caso de dehiscencia de la anastomosis (Figura 36).
2. Dilatación: en cuatro ejemplares del grupo de hilos con células se observó dilatación. En ningún ejemplar del segundo grupo hubo dilatación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 0,70).
3. Obstrucción: en dos de los casos que presentaron dilatación hubo también obstrucción. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 0,46).
4. Adherencias generales: en todos los ejemplares de ambos grupos las adherencias fueron difusas. Había múltiples adherencias a la lámina de látex que cubría la anastomosis.
5. Separación de adherencias: en todos los ejemplares se hallaron adherencias firmes que hubo que separar con corte (100% grado 3).
6. Adherencias a la anastomosis: no se formaron adherencias a la línea anastomótica, ya que ésta permaneció cubierta en todos los ejemplares por la lámina de látex.

7. Estructuras adheridas: en cinco ejemplares del primer grupo hubo dos estructuras adheridas (epiplon e intestino delgado) y en dos tres estructuras (además de epiplon e intestino delgado había colon u otras). En el segundo grupo hubo dos animales con dos estructuras adheridas (epiplon e intestino delgado), tres con tres estructuras (epiplon, intestino delgado y colon o bazo) y en un caso hubo cuatro estructuras adheridas (epiplon, intestino delgado, colon y bazo).

8. Índice de adherencias: la media del primer grupo fue 8,28 (DS 0,51) y la del segundo 8,83 (DS 0,75). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 0,14).

9. Presión de ruptura: la media del grupo de anastomosis realizadas con hilos recubiertos de células fue 29,27 mm Hg (DS 21,56) y la media del segundo grupo fue 26,92 mm Hg (DS 20,49). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 0,77).

10. Punto de ruptura: en todos los casos la línea de sutura fue el punto de ruptura.

En el grupo de anastomosis con células madre hubo cinco patrones de fuga y uno de estallido. En las otras anastomosis hubo cuatro patrones de fuga y tres de estallido.

11. Radio: la media del primer grupo fue 0,29 cm (DS 0,03) y la del segundo 0,28 cm (DS 0,03). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 0,42).

12. Tensión de ruptura: en el grupo de anastomosis con células la media fue $12,18 \times 10^3$ dinas/cm (DS 9,38) y en el segundo grupo $10,06 \times 10^3$ dinas/cm (DS 7,71). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 0,88).



Figura 36. Aspecto de una anastomosis cubierta por lámina de látex al cuarto día postoperatorio.

El intestino delgado y el epiplon cubren por completo la lámina de látex que protege la anastomosis. Hay múltiples adherencias y líquido peritoneal seroso de escasa cuantía.

Anastomosis críticas con lámina de látex

		INFLAMACIÓN		ADHERENCIAS				RESISTENCIA		
Anastomosis críticas	De	Di	Ob	AG	Se	EA	IA	PR	r	TR
Biosuturas	NO	SI	SI	3	3	1,2,3	9	29,76	0,28	11,34
	NO	SI	NO	3	3	1,2	8	44,94	0,36	21,89
	NO	NO	NO	3	3	1,2	8	5,52	0,28	2,10
	NO	NO	NO	3	3	1,2,4	9	37,52	0,31	15,89
	NO	NO	NO	3	3	1,2	8	11,61	0,28	4,42
	NO	SI	NO	3	3	1,2	8	63,71	0,30	25,63
MEDIA							8,28	29,27	0,29	12,18
Control	NO	NO	NO	3	3	1,2,4	9	25,69	0,27	9,24
	NO	NO	NO	3	3	1,2,4	9	61,15	0,28	23,31
	NO	NO	NO	3	3	1,2	8	9,58	0,22	2,84
	NO	NO	NO	3	3	1,2	8	40,73	0,27	14,66
	NO	NO	NO	3	3	1,2,4,4	10	12,89	0,318	5,45
	NO	NO	NO	3	3	1,2,4	9	11,5	0,318	4,87
MEDIA							8,83	26,92	0,28	10,06

Tabla 8. Resultados de las anastomosis críticas con lámina de látex al cuarto día postoperatorio.

De: dehiscencia, Di: dilatación, Ob: obstrucción, AG: adherencias generales, Se: separación de adherencias, EA: estructuras adheridas, IA: índice de adherencias, PR: presión de ruptura (mm Hg), r: radio (cm), TR: tensión de ruptura ($\times 10^3$ dinas/cm).

Los ejemplares 7, 8, 13 (grupo biosuturas) y 1, 6, 9 (grupo control) fallecen antes del 4º día postoperatorio.

No se encontró dehiscencia de la anastomosis cólica.

Modelo 2.1: anastomosis en icodextrina 4% (Tabla 9)

Uno de los ejemplares intervenidos (el número 6), que correspondía al grupo tratado con icodextrina, falleció al cuarto día postoperatorio. Las otras nueve ratas se sacrificaron al cuarto día postoperatorio. Finalmente se analizaron cuatro animales que se habían tratado con icodextrina (aunque uno tuvo dehiscencia de la sutura y no se pudieron cuantificar todas las variables) y cuatro que no habían sido tratados. La evaluación de todas las variables se llevó a cabo sin saber si la anastomosis estuvo en icodextrina o no, aunque al cuarto día postoperatorio todavía quedaba una mínima cantidad de líquido intraperitoneal.

1. Dehiscencia: hubo una dehiscencia parcialmente cubierta en una de las ratas en las que se había puesto icodextrina 4%. En el resto no hubo dehiscencias (Figura 37). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 0,44).

2. Dilatación: no se encontró dilatación cólica en ningún ejemplar.

3. Obstrucción: tampoco hubo ningún caso de obstrucción.

4. Adherencias generales: las adherencias fueron locales en los tres ejemplares en los que la anastomosis estuvo en icodextrina. En el resto de animales se encontraron adherencias locoregionales en una y difusas en las otras cuatro.

5. Separación de adherencias: en las que estuvieron en icodextrina dos tenían adherencias fáciles de separar (66,6% grado 1) y una tenía adherencias que se separaban con instrumento romo (33,3% grado 2). En los cinco ejemplares de anastomosis no tratadas las adherencias precisaron corte para su separación (100% grado 3).

6. Adherencias a la anastomosis: en un caso las adherencias cubrían el 75% de la anastomosis (33,3% grado 3) y en dos en 100% (66,6% grado 4) en el grupo de icodextrina. En el grupo control un ejemplar presentó 75% de adherencias a la anastomosis (20% grado 3) y cuatro 100% (80% grado 4).

7. Estructuras adheridas: en dos ejemplares del grupo de icodextrina hubo una estructura adherida y en uno hubo dos estructuras adheridas. En el grupo control hubo un ejemplar con dos estructuras adheridas, dos con tres estructuras y tres con cuatro estructuras.
8. Índice de adherencias: la media del grupo de anastomosis tratadas con icodextrina fue 3,67 (DS 1,15) y la media del grupo control 9 (DS 0,7). Sí que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 0,02).
9. Presión de ruptura: Si aceptamos que las anastomosis dehiscentes en nuestra serie tienen una presión de 5 mmHg, la media del grupo con icodextrina fue 17,76 mm Hg (DS 18,95) y la media del grupo control 39,18 mm Hg (DS 17,16). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 0,07).
10. Punto de ruptura: en todos los casos la línea anastomótica fue el punto de ruptura. El patrón gráfico de ruptura de las tres anastomosis en las que había icodextrina fue de fuga. En el otro tipo de anastomosis hubo un patrón de estallido y cuatro de fuga.
11. Radio: la media del grupo tratado fue 0,27 cm (DS 0,02) y la del grupo control 0,28 cm (DS 0,03). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 0,52).
12. Tensión de ruptura: la media del grupo con icodextrina fue $6,69 \times 10^3$ dinas/cm (DS 12,84) y la del grupo sin tratamiento $15,16 \times 10^3$ dinas/cm (DS 7,9). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 0,07).



Figura 37. Aspecto de la cavidad peritoneal tras la cirugía y el tratamiento con icodextrina.

El intestino delgado y el colon se identifican con facilidad debido a la escasez de adherencias peritoneales entre ellos. Tampoco existen adherencias a la laparotomía.

Anastomosis críticas con icodextrina 4%

		INFLAMACIÓN		ADHERENCIAS				RESISTENCIA		
	De	Di	Ob	AG	Se	EA	IA	PR	r	TR
Anastomosis crítica	NO	NO	NO	1	2	1,2	5	46,72	0,30	18,76
	NO	NO	NO	1	1	1	3	9,28	0,27	33,32
	NO	NO	NO	1	1	2	3	22,82	0,25	7,70
	SI*									
	SI**									
MEDIA							3,67	17,76	0,27	6,69
Anastomosis control	NO	NO	NO	3	3	1,2	8	68,16	0,31	28,82
	NO	NO	NO	3	3	1,2,3	9	23,38	0,27	8,39
	NO	NO	NO	2	3	1,2,3,4	9	36,37	0,28	13,83
	NO	NO	NO	3	3	1,2,3,4	10	37,67	0,23	11,92
	NO	NO	NO	3	3	1,2,3	9	30,33	0,31	12,82
MEDIA							9	39,18	0,28	15,16

Tabla 9. Resultados de las anastomosis críticas con icodextrina vs anastomosis control al cuarto día postoperatorio.

De: dehiscencia, Di: dilatación, Ob: obstrucción, AG: adherencias generales, Se: separación de adherencias, EA: estructuras adheridas, IA: índice de adherencias, PR: presión de ruptura (mm Hg), r: radio (cm), TR: tensión de ruptura ($\times 10^3$ dinas/cm).

*Ejemplar 6: fallece al 4º día postoperatorio, antes de la medida de variables, por peritonitis por dehiscencia anastomótica.

**Ejemplar 7: dehiscencia parcialmente cubierta.

Modelo 2.2: anastomosis en icodextrina 4% y suturas recubiertas con células madre (Tabla 10).

Se intervinieron 22 animales. En todos se realizó una anastomosis cólica seguida de inyección intraperitoneal de icodextrina 4% para disminuir las adherencias. En la mitad la anastomosis se llevó a cabo con suturas recubiertas de células madre y en la otra mitad con suturas convencionales (polyglactin-910). Doce de los animales que se intervinieron pesaban entre 110 g y 220 g, menos de 250 g (peso mínimo establecido para su uso), por lo que no se incluyeron finalmente en el análisis de variables. De los diez animales analizados, uno del grupo de anastomosis sin células falleció al cuarto día postoperatorio, antes de la medida de las variables por peritonitis secundaria a dehiscencia anastomótica.

1. Dehiscencia: Hubo dehiscencia en un animal del grupo de anastomosis con hilos convencionales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p 0,4$).
2. Dilatación: No hubo dilatación cólica en ninguno de los ejemplares analizados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p 1$).
3. Obstrucción: No se encontró obstrucción en el colon de los animales estudiados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p 1$).
4. Adherencias generales: Las adherencias encontradas fueron locales en dos ejemplares (33,33% grado 1), locoregionales en los otros tres (49,98% grado 2) y difusas en uno (16,66% grado 2), en el grupo de anastomosis con células madre. En el grupo de hilos convencionales todos los animales presentaron adherencias locoregionales (100% grado 2).
5. Separación de adherencias: En tres animales del grupo de hilos con células madre las adherencias se separaron por tracción (49,98% grado 1), en uno otro con instrumental

romo (16,66% grado 2) y en dos con corte (33,33% grado 1). En el grupo de hilos convencionales en dos animales se usó el corte para separar las adherencias (66,6% grado 3) y en uno la tracción (33,3% grado 1).

6. Adherencias a la anastomosis: En todos los animales, de ambos grupos, hubo recubrimiento de la línea anastomótica.

7. Estructuras adheridas: Un ejemplar del grupo de hilos con células madre tenía adherido el intestino delgado y los otros cinco el intestino delgado y el epiploon. En el grupo de anastomosis convencionales en dos casos se adhirieron dos estructuras y en un caso tres (en todos el intestino delgado y el epiploon y en este último el colon).

8. Índice de adherencias: la media del índice de adherencias en el grupo de suturas con células fue 5,66 (DS 1,63) y en el otro grupo 6,33 (DS 2,08). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 0,59).

9. Presión de ruptura: la media de la presión de ruptura en el grupo de anastomosis con suturas con células madre fue 62,96 mmHg (DS 14,83) y en el grupo de suturas convencionales 25,12 mmHg (DS 28,33). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 0,08).

10. Punto de ruptura: en todos los casos (de ambos grupos) al cuarto día postoperatorio la línea anastomótica fue el punto de ruptura.

En el grupo de anastomosis en las que había células hubo un patrón de gráfico de ruptura tipo estallido en cuatro casos y dos tipo fuga. En el grupo de anastomosis sin células hubo un patrón de ruptura tipo estallido y dos tipo fuga.

11. Radio de la anastomosis: la media del radio de las anastomosis del primer grupo fue 0,36 cm (DS 0,03) y del segundo 0,31 cm (DS 8,31). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 0,98).

12. Tensión de ruptura: la media de las tensiones de ruptura en el grupo de anastomosis con células fue $30,32 \times 10^3$ dinas/cm (DS 8,31) y $11,19 \times 10^3$ dinas/cm (DS 13,35) en el otro. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 0,88).

Anastomosis críticas con icodextrina 4% (biosuturas vs control)

		INFLAMACIÓN		ADHERENCIAS				RESISTENCIA		
	De	Di	Ob	AG	Se	EA	IA	PR	r	TR
Biosuturas	NO	NO	NO	1	1	2	4	60,26	0,35	28,05
	NO	NO	NO	2	2	1,2	6	51,03	0,31	21,03
	NO	NO	NO	1	1	1,2	4	55,01	0,35	25,60
	NO	NO	NO	2	1	1,2	5	90,17	0,36	43,17
	NO	NO	SI	2	3	1,2	7	52,41	0,38	26,48
	NO	SI	NO	3	3	1,2	8	68,89	0,41	37,56
MEDIA							5,66	62,96	0,36	30,32
Control	NO	NO	NO	2	3	1,2	7	5	0,25	1,66
	NO	NO	NO	2	3	1,2,3	8	25,39	0,31	10,46
	SI							5	0,35	2,32
	NO	NO	NO	2	1	1,2	4	65,11	0,35	30,30
MEDIA							6,33	25,12	0,31	11,19

Tabla 10. Resultados de las anastomosis críticas con icodextrina 4% al cuarto día postoperatorio.

De: dehiscencia, Di: dilatación, Ob: obstrucción, AG: adherencias generales, Se: separación de adherencias, EA: estructuras adheridas, IA: índice de adherencias, PR: presión de ruptura (mm Hg), r: radio (cm), TR: tensión de ruptura ($\times 10^3$ dinas/cm).

El ejemplar 6 fallece al 4º día postoperatorio, antes de la medida de variables, por peritonitis secundaria a dehiscencia anastomótica.

Comparación de las anastomosis realizadas con biosuturas con sus controles (Tabla 11)

A continuación se comparan todas las anastomosis realizadas con hilos con células madre con las anastomosis control al cuarto día postoperatorio. En cada grupo se incluyen anastomosis simples y anastomosis críticas.

1. Dehiscencia: Hubo un caso de dehiscencia anastomótica en el grupo de anastomosis control que correspondió a una anastomosis crítica. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 0,44).
2. Dilatación: Hubo dilatación en cuatro casos del grupo de anastomosis con células madre y en tres del otro grupo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 1).
3. Obstrucción: Un caso de las anastomosis con células tuvo obstrucción y dos de las anastomosis con hilos convencionales también. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 0,53).
4. Índice de Adherencias: La media de grupo con células fue de 5,7 (DS 1,49) y la media del grupo control 7,8 (DS 1,95). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 0,03).
5. Presión de Ruptura: La PR media del grupo de anastomosis con células fue 56,24 mm Hg (DS 15,57) y la PR media del grupo de anastomosis con hilos convencionales 34,92 mm Hg (DS 23,08). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p 0,06).
6. Radio de la anastomosis: el radio medio del primer grupo fue 0,33 cm (DS 0,05) y del segundo 0,29 cm (DS 0,05). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p 0,07) (Figura 38).
7. Tensión de ruptura: la TR media del grupo de anastomosis con células fue 25,47 x 10^3 dinas/cm (DS 9,05) y la TR media del grupo de anastomosis con hilos

convencionales $13,61 \times 10^3$ dinas/cm (DS 10,26). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p 0,02).

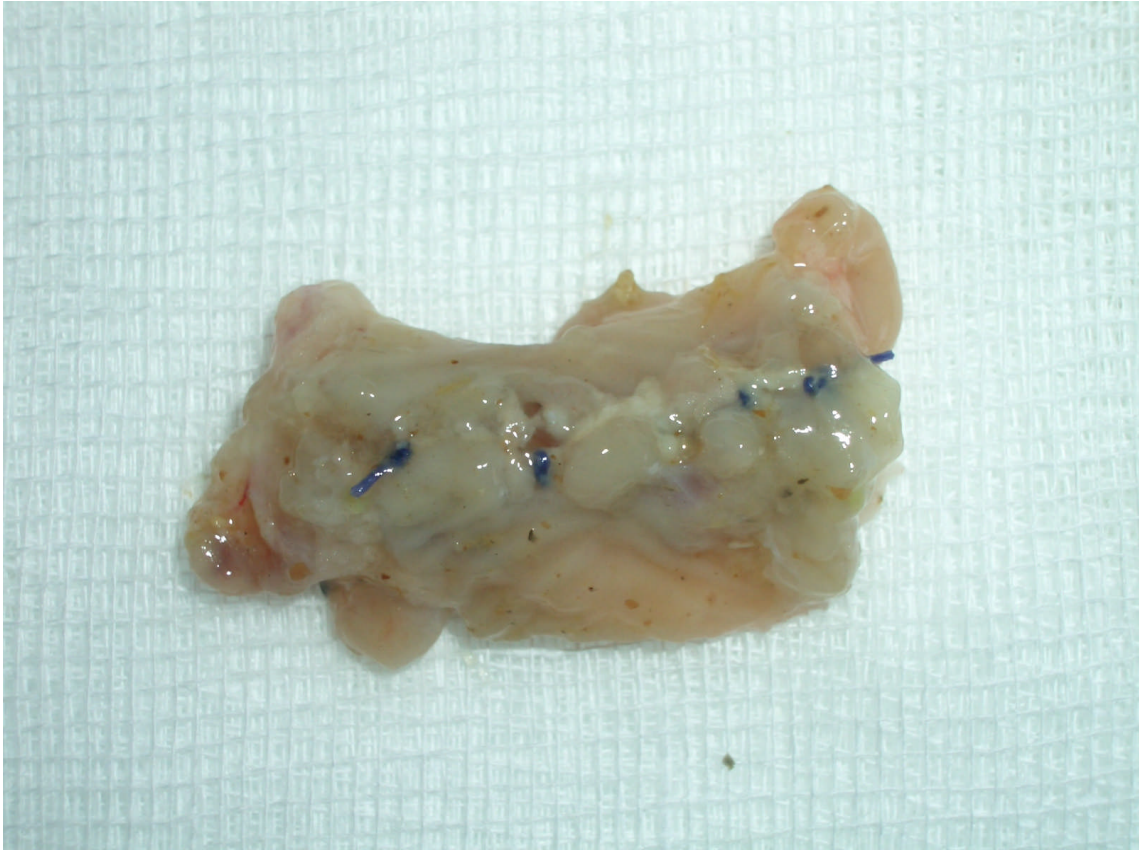


Figura 38. Aspecto de la cara interna de una anastomosis al cuarto día postoperatorio.

Puede observarse la línea de cicatrización que existe entre los dos extremos del colon y los puntos que se han dado para realizar la anastomosis.

Anastomosis con biosuturas vs anastomosis control al 4° día postoperatorio

		INFLAMACION		ADHERENCIAS				RESISTENCIA		
	De	Di	Ob	AG	Se	EA	IA	PR	r	TR
Biosuturas simples	NO	NO	NO	2	1	1,3	5	43,1	0,38	21,78
	NO	SI	NO	2	1	1,2	5	41,73	0,35	19,42
	NO	SI	NO	2	1	2,4	5	63,1	0,22	18,46
	NO	SI	NO	3	3	1,2	8	36,7	0,27	13,17
Biosuturas críticas (Modelo 2.2)	NO	NO	NO	1	1	2	4	60,26	0,35	28,05
	NO	NO	NO	2	2	1,2	6	51,03	0,31	21,03
	NO	NO	NO	1	1	1,2	4	55,01	0,35	25,60
	NO	NO	NO	2	1	1,2	5	90,17	0,36	43,17
	NO	NO	SI	2	3	1,2	7	52,41	0,38	26,48
	NO	SI	NO	3	3	1,2	8	68,89	0,41	37,56
MEDIA							5,7	56,24	0,33	25,47
Control simples	NO	SI	SI	3	3	1,2,3,4	10	52	0,24	16,59
	NO	SI	NO	2	3	1,2,3	8	50,47	0,35	23,49
	NO	NO	NO	3	3	1,2,3	9	52,06	0,25	17,30
	NO	SI	SI	3	3	1,2,4	9	24,4	0,24	7,78
Control Críticas (Modelo 2.2)	NO	NO	NO	2	3	1,2	7	5	0,25	0,66
	NO	NO	NO	2	3	1,2,3	8	25,39	0,31	10,46
	SI							5	0,35	2,32
	NO	NO	NO	2	1	1,2	4	65,11	0,35	30,30
MEDIA							7,85	34,92	0,29	13,61

Tabla 11. Resultados de las anastomosis con biosuturas vs anastomosis control al cuarto día postoperatorio.

De: dehiscencia, Di: dilatación, Ob: obstrucción, AG: adherencias generales, Se: separación de adherencias, EA: estructuras adheridas, IA: índice de adherencias, PR: presión de ruptura (mm Hg), r: radio (cm), TR: tensión de ruptura ($\times 10^3$ dinas/cm).

Comparación de las anastomosis críticas realizadas con biosuturas (modelo 2.1) con todas las anastomosis críticas realizadas con hilos convencionales (modelo 2.1 y 2.2) (Tabla 12)

1. Dehiscencia: Hubo tres dehiscencias en el grupo de anastomosis críticas control. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p 0,22).
2. Dilatación: Hubo un caso de dilatación en el grupo de anastomosis críticas con hilos con células madre. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p 1).
3. Obstrucción: Hubo un caso de dilatación en el grupo de anastomosis críticas con hilos con células madre. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p 1).
4. Índice de Adherencias: El Índice de Adherencias medio del grupo de anastomosis con hilos con células madre fue 5,66 (DS 1,63) y el del grupo de anastomosis control 5 (DS 2,09). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos (p 0,465).
5. Presión de Ruptura: La PR media del grupo de anastomosis con células fue 62,96 mm Hg (DS 14,83) y la PR media del grupo de anastomosis con hilos convencionales 21,03 mm Hg (DS 21,76). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p 0,006).
6. Radio de la anastomosis: el radio medio del primer grupo fue 0,36 cm (DS 0,03) y del segundo 0,29 cm (DS 0,03). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p 0,007).
7. Tensión de ruptura: la TR media del grupo de anastomosis con células fue $30,32 \times 10^3$ dinas/cm (DS 8,31) y la TR media del grupo de anastomosis con hilos convencionales $12,02 \times 10^3$ dinas/cm (DS 12,56). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p 0,02).

Anastomosis críticas con biosuturas vs anastomosis críticas control

		INFLAMACIÓN		ADHERENCIAS			RESISTENCIA			
	De	Di	Ob	AG	Se	EA	IA	PR	r	TR
Biosuturas críticas	NO	NO	NO	1	1	2	4	60,26	0,35	28,05
	NO	NO	NO	2	2	1,2	6	51,03	0,31	21,03
	NO	NO	NO	1	1	1,2	4	55,01	0,35	25,60
	NO	NO	NO	2	1	1,2	5	90,17	0,36	43,17
	NO	NO	SI	2	3	1,2	7	52,41	0,38	26,48
	NO	SI	NO	3	3	1,2	8	68,89	0,41	37,56
MEDIA							5,66	62,96	0,36	30,32
Críticas modelo 2.2	NO	NO	NO	2	3	1,2	7	5	0,25	1,662
	NO	NO	NO	2	3	1,2,3	8	25,39	0,31	10,46
	SI							5	0,35	2,32
	NO	NO	NO	2	1	1,2	4	65,11	0,35	30,30
Críticas modelo 2.1	NO	NO	NO	1	2	1,2	5	46,72	0,302	18,76
	NO	NO	NO	1	1	1	3	9,28	0,27	33,32
	NO	NO	NO	1	1	2	3	22,82	0,254	7,7
	SI							5	0,275	1,82
	SI							5	0,275	1,82
MEDIA							5	21,03	0,29	12,02

Tabla 12. Resultados de las anastomosis críticas con biosuturas vs anastomosis críticas con hilos convencionales al cuarto día postoperatorio.

De: dehiscencia, Di: dilatación, Ob: obstrucción, AG: adherencias generales, Se: separación de adherencias, EA: estructuras adheridas, IA: índice de adherencias, PR: presión de ruptura (mm Hg), r: radio (cm), TR: tensión de ruptura ($\times 10^3$ dinas/cm).

DISCUSIÓN

El proceso de cicatrización de los tejidos es complejo, y aunque se conocen muchos de los pasos que comprende, todavía no se han realizado grandes avances para mejorarlo. Precisamente la cicatrización es la base de la actividad quirúrgica, y el factor determinante del éxito de las anastomosis intestinales. Como ya hemos mencionado, incluso realizando una correcta técnica quirúrgica, sabemos que aparecerán dehiscencias en un porcentaje variable de las anastomosis intestinales que realicemos y que este hecho lleva asociado un aumento en la morbi-mortalidad de los pacientes. Por esta razón intentamos buscar un método para mejorar la cicatrización y disminuir las dehiscencias anastomóticas.

Las células madre adultas mesenquimales son progenitoras de células de las tres capas embrionarias y participan en los procesos de cicatrización y regeneración de los tejidos ^{209, 212}. Nuestro objetivo ha sido mejorar la cicatrización de las anastomosis del colon mediante la aplicación de células madre en un soporte novedoso: el hilo de sutura. Mediante este método podemos llegar a la zona de cicatrización, al lugar en el que suelen producirse las dehiscencias: el paso del hilo a través del tejido. Esto se debe al desgarró microscópico del tejido al soportar la mínima tensión que permite la estanqueidad de la anastomosis.

Consideramos necesario evaluar el efecto de las suturas recubiertas con células madre en diferentes días del postoperatorio. Por ello planeamos un experimento en cuatro grupos de diez ratas cada uno. Cada grupo se sacrificó al día 4, 7 14 y 21 respectivamente del postoperatorio. En cada rata se realizó una anastomosis colo-cólica, en la mitad de los ejemplares de cada grupo se utilizaron hilos recubiertos de células madre y en la otra mitad hilos convencionales (en ambos casos polyglactin 910) y así pudimos comparar los dos tipos de sutura en las anastomosis. El cuarto día

postoperatorio es el de menor resistencia de las anastomosis digestivas, y el que más preocupa al cirujano en la práctica diaria. El objetivo de analizar el efecto de las células madre a más largo plazo ha sido valorar si existe disminución en la inflamación crónica por presencia de un cuerpo extraño, el hilo de sutura, estudiar los efectos adversos que pudieran aparecer y con ello conocer mejor la biología de las células madre en la situación planteada.

El segundo escenario en el que hemos utilizado las biosuturas son las anastomosis cólicas sin adherencias peritoneales, que se correspondería en la práctica habitual quirúrgica con las anastomosis realizadas en zonas del tubo digestivo en las que no hay adherencias que las recubran (esófago y recto medio y bajo, por debajo de la reflexión peritoneal), y que se consideran críticas por su alta tasa de dehiscencias. Para conseguir este tipo de anastomosis de baja resistencia por no tener adherencias planteamos dos modelos.

- a) En el primero recubrimos una anastomosis colo-cólica con una lámina de látex.

Con ello pretendimos, por una parte, evitar la formación de adherencias alrededor de la línea de sutura y, por otra, empeorar la cicatrización de las anastomosis, ya que la presencia de látex cerca de una anastomosis aumenta las dehiscencias^{210, 5}.

- b) En el segundo modelo dejamos la anastomosis colo-cólica en un baño de icodextrina al 4% intraperitoneal que evite la formación de adherencias.

Ambos modelos se evaluaron al cuarto día postoperatorio, porque es el día en el que una mejoría en la calidad de las anastomosis tendría relevancia clínica.

El modelo de experimentación utilizado fue la rata. En todos aquellos experimentos en los que se utilizaron biosuturas fueron empleadas ratas del tipo BDIX, escogidas por ser animales singénicos. Esta característica permite la aplicación de las

células madre aisladas de un ejemplar-donante en otros ejemplares-receptores distintos del donante, pero siempre pertenecientes al tipo BDIX, sin riesgo de rechazo. En nuestra experimentación esto nos permitió obtener las células madre adultas derivadas del tejido adiposo de dos ejemplares y trasplantárselas mediante el hilo de sutura a todas las demás BDIX sin riesgo de rechazo. En caso de no haber utilizado animales singénicos tendríamos que haber obtenido las células madre adultas del tejido adiposo de cada rata para preparar su biosutura autóloga (donante y receptor son el mismo individuo). Esta situación hubiese complicado el modelo quirúrgico y podría haber interferido con el mismo, así que se evitó utilizando animales singénicos.

En el modelo de anastomosis con icodextrina al 4%, en el que no se usaron biosuturas, el tipo de rata utilizada fue Sprague-Dawley.

El hilo de sutura con células madre

En el caso de las anastomosis cólicas el hilo de sutura ha resultado ser un buen vehículo para las células madre. Usamos un multifilamento reabsorbible por varias razones. La primera, porque es un hilo que se utiliza muy frecuentemente en todo tipo de anastomosis y especialmente en las digestivas. Así el modelo se acerca lo más posible a la clínica.

Respecto a la decisión de utilizar un hilo reabsorbible, sabemos que la resistencia de las anastomosis es máxima a partir de la tercera semana, por lo tanto, no pensamos que en este tipo de tejido con el uso de un hilo irreabsorbible se obtenga un mayor beneficio que con el uso de uno reabsorbible como el polyglactin 910, que permanece alrededor de 70 días en la cavidad peritoneal, manteniendo su fuerza tensil unos 28 días ²¹¹. Una vez sobrepasado en período crítico de aparición de dehiscencias (del tercer al quinto día postoperatorio) la resistencia de la anastomosis es la suficiente

como para permitir que vaya disminuyendo la fuerza tensil de la sutura sin peligro de dehiscencias. De hecho, de nuestros resultados se desprende que a partir del día 14 todas las anastomosis son más resistentes que otras partes del colon intacto, como el ciego, lugar por el que rompieron todas las piezas al someterlas a la inyección de suero con azul de metileno. Las anteriores razones nos decidieron a usar el polyglactin 910, que es un multifilamento trenzado reabsorbible. Experimentos adicionales no incluidos en este trabajo nos han demostrado la capacidad de adhesión y crecimiento de las células madre adultas derivadas de tejido adiposo sobre otros tipos de suturas comerciales tanto monofilamentos como multifilamentos, reabsorbibles y no reabsorbibles.

Cada biosutura se usó en dos puntos de la anastomosis por una razón. Se comprobó que a partir del segundo pase a través de tejido muscular no quedaban células madre adheridas al hilo (las células estaban marcadas con GFP y no se visualizaban sobre los hilos a partir del segundo pase). Es decir, todas las células habían quedado retenidas en el tejido. Dando dos puntos con cada biosutura nos aseguramos de que todas las células madre que tapizan el hilo (cada sutura se carga con $1,5 \times 10^6$ células) se aplican en la anastomosis.

El polyglactin 910 recubierto de células madre ha resultado ser un material muy manejable, y podría ser un buen material en el futuro para tejer mallas reabsorbibles a las que se adhieran las células madre. Estas mallas podrían utilizarse como matriz en terapia celular en tejidos blandos, ya sea con un fin de regeneración o de cicatrización. Habría que valorar también, en un futuro, cómo pueden utilizarse células madre cuando se usan grapadoras intestinales, por ejemplo en anastomosis esofágicas o de recto bajo, que tienen un alto riesgo de dehiscencia y en las que la aparición de las grapadoras circulares supuso un gran avance técnico.

La aparición, en el futuro, de bancos de células madre para uso alogénico (donante y receptor son distintos individuos), basándonos en que las células madre mesenquimales manifiestan efecto inmunosupresor y no expresan el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo II, permitiría la disponibilidad inmediata de biosuturas “universales” y su uso de rutina en aquellas anastomosis que se considerasen críticas.

Disminución de las adherencias peritoneales

Al incrementar el número de células madre en la cicatrización del colon hemos obtenido anastomosis resistentes, pero con menor índice de adherencias al cuarto y séptimo día postoperatorio. Al comparar de forma global las anastomosis con biosuturas (simples y críticas) con las anastomosis con hilos convencionales (simples y críticas) encontramos que el índice de adherencias es menor en las primeras de forma estadísticamente significativa al cuarto día postoperatorio.

Como se ha comentado, *in vitro*, se conoce la propiedad antiinflamatoria de las células madre ¹⁶⁷ y, en nuestro caso, esta es una de las hipótesis que podría explicar la menor aparición de adherencias. Hay una serie de eventos posteriores a la cirugía que promueven la respuesta inflamatoria (actividad reducida del activador del plasminógeno, aumento en el depósito de matriz extracelular, producción aumentada de citoquinas, aumento de la angiogénesis y reducción de los procesos de apoptosis celular). Esta inflamación conduce posteriormente a la fibrosis causante de las adherencias. Mediante el efecto antiinflamatorio de las células madre estos fenómenos podrían estar disminuidos y que ésta fuera la razón de la disminución en el número de adherencias.

La inflamación también podría ser menor debido al recubrimiento celular de las suturas. Al tratarse de un trasplante celular entre animales singénicos la reacción a cuerpo extraño estaría disminuida. En cualquier caso, *in vivo* falta una mejor

cuantificación de la inflamación de las anastomosis para poder confirmar que ésta fue la causa de la disminución de las adherencias. No hemos podido constatar mediante el estudio histológico que haya diferencias en cuanto a inflamación a diferentes días del postoperatorio. La utilización de otros métodos de medición de la inflamación podría ofrecer mejores resultados para discernir si existe correlación entre inflamación y número de adherencias.

Existe otra hipótesis que podría explicar que la presencia de células madre haya disminuido la cantidad y la calidad de las adherencias postoperatorias. Cabe la posibilidad de que estas células se diferencien a células mesoteliales que, por una parte, recubran la zona de daño peritoneal (causante del depósito de fibrina y posteriormente de colágeno) y, por otra, produzcan tPA que impida la disminución de la actividad fibrinolítica postoperatoria. En un estudio *in vivo* se han relacionado las adherencias peritoneales con las células madre mesenquimales ²¹³. Realizando una pequeña extirpación del peritoneo de la rata para estimular la formación de adherencias e inyectando posteriormente por vía intraperitoneal células madre mesenquimales se comprobó que disminuían las adherencias en el postoperatorio. Este efecto no se consiguió con la inyección de células musculares de rata en las mismas condiciones. El posible mecanismo de acción, según sus autores, sería la diferenciación de las células madre mesenquimales a células mesoteliales capaces de restituir el peritoneo dañado ²¹³. De hecho, la inyección intraperitoneal de células mesoteliales en situaciones de daño peritoneal (en modelos animales de peritonitis estafilocócica y abrasión peritoneal) mejora la reparación de la serosa y previene las adherencias ^{214, 215}. El origen de las células mesoteliales, las características de las células progenitoras mesoteliales y su parecido con las células madre mesenquimales, el proceso de reparación del peritoneo y

la posibilidad de que exista una célula madre mesotelial están actualmente en revisión

216.

La cicatrización mesotelial es motivo de estudio desde 1919 cuando Hertzler observó que tanto las “heridas peritoneales” pequeñas como las grandes curaban en el mismo período de tiempo (en 7-10 días). Este hallazgo le llevó a postular que la cicatrización no podía ser debida solamente a la proliferación y migración celular desde los bordes de la “herida” como ocurre en los epitelios. Desde entonces se han propuesto varias fuentes de progenitores celulares de las células mesoteliales: transformación de macrófagos, exfoliación de células mesoteliales de superficies serosas adyacentes, precursores mesenquimales subserosos, precursores circulantes derivados de médula ósea y progenitores mesoteliales flotantes en el líquido peritoneal (*free-floating mesothelial cells*) (Figura 39). Los progenitores mesoteliales flotantes en el líquido peritoneal comparten características con las células madre mesenquimales. En los modelos animales de formación de adherencias postoperatorias, tanto la inyección intraperitoneal de células mesoteliales como de células madre mesenquimales reducen la formación de adherencias peritoneales^{213, 214, 215}. Estamos ante dos estirpes celulares con características fenotípicas comunes que producen el mismo efecto ante el daño peritoneal.

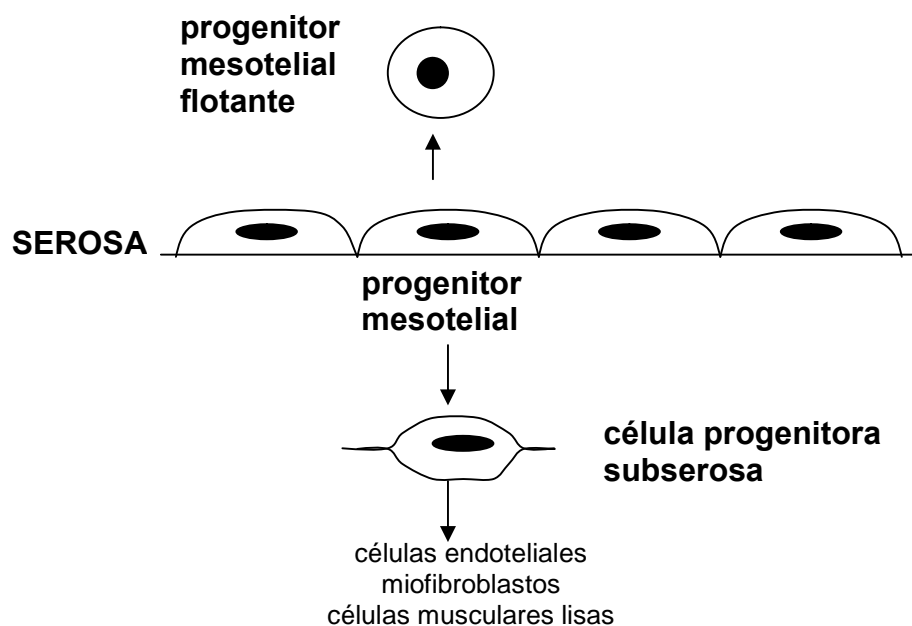


Figura 39. Representación de la reparación mesotelial ²¹⁶.

El progenitor mesotelial residente en la serosa se transdiferenciaría a célula progenitora subserosa con capacidad de dar lugar a miofibroblastos, células musculares lisas y células endoteliales. Además, podrían diferenciarse a progenitores mesoteliales flotantes en el líquido peritoneal (*free-floating mesothelial cells*) en caso de lesión de la serosa.

En este sentido nos resulta interesante la actividad del epiplon en situaciones de peritonitis. Por todos es conocida su migración y adherencia a los tejidos inflamados dentro de la cavidad peritoneal. El epiplon se compone básicamente de dos capas de células mesoteliales que recubren adipocitos dispuestos en un tejido conectivo muy vascularizado con alto contenido en células madre ²¹⁷. Ya sea por efecto de las células mesoteliales, por los adipocitos o por las células madre, el epiplon tiene efecto angiogénico, antiinflamatorio, neurotrófico ²¹⁸, defensivo ante la infección y acelerador en la curación de heridas o perforaciones de víscera hueca. Por todas estas propiedades

se usa para recubrir anastomosis intestinales, como injerto en heridas tórpidas o como colgajo en heridas quirúrgicas infectadas ^{219, 220, 221, 222}. Se desconoce el mecanismo último de su actividad, pero se sabe que participan mediadores como el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-beta 1), con el resultado final de abundante producción de colágeno ²²³. Esto explicaría su tendencia a formar adherencias para aislar los procesos inflamatorios en la cavidad peritoneal, como las anastomosis, y sería una de las razones para explicar porqué las anastomosis dentro de la cavidad peritoneal se consideran más seguras que las realizadas en zonas del tubo digestivo sin posibilidad de actuación del epiplon. Sin embargo, el efecto protector del epiplon sobre las anastomosis podría responder a más causas, como la presencia de progenitores mesoteliales en el peritoneo que lo recubre, que podrían intervenir en la reparación superficial de la anastomosis, y la participación de las células madre mesenquimales en la cicatrización.

El hallazgo de que las células madre mesenquimales disminuyen las adherencias peritoneales podría tener aplicación también en otros campos de la cirugía fuera de la cavidad peritoneal. Por ejemplo, en suturas tendinosas, en las que la aparición de fibrosis postoperatoria puede arruinar una correcta técnica quirúrgica.

La medida de la resistencia de la anastomosis

Para medir la calidad de las anastomosis cólicas hemos utilizado como variable la presión de ruptura (PR). Esta medida define la máxima presión que alcanza la anastomosis antes de la dehiscencia o ruptura del colon.

Existe otra variable ampliamente descrita en la literatura que se ha utilizado para este mismo fin: la fuerza de rotura (*breaking strength*, FR). Se mide resecaando el segmento del colon que contiene la anastomosis y montándolo en un tensiómetro que

ejerce una fuerza de distracción de los extremos de la pieza, perpendicular a la anastomosis, hasta que ésta se rompe. La fuerza necesaria para hacer que los dos cabos de la anastomosis se separen es la fuerza de rotura ²²⁴.

Según algunos autores la PR es una medida más sensible que la FR ^{225, 226}. Cuando se comparan ambas variables la PR es el parámetro que resulta más adecuado para medir resistencia en la primera semana tras la cirugía. La presión de ruptura se incrementa progresivamente durante los primeros días del postoperatorio de la formación de una anastomosis cólica. Sin embargo, la FR permanece constante los primeros cuatro días, demostrando que no es lo suficientemente sensible como para medir los cambios precoces en la cicatrización cólica ^{19, 226}.

Como nosotros queríamos evaluar la resistencia de las anastomosis durante el período crítico de aparición de dehiscencias, del tercer al quinto día postoperatorio, decidimos utilizar la PR. Ha resultado ser una forma de medida reproducible, con la que se han podido detectar cambios entre diferentes anastomosis al cuarto día del postoperatorio.

En las anastomosis dehiscentes se consideró que la PR era 5 mmHg. Esta es la presión media basal de las anastomosis antes de iniciar la inyección de suero con azul de metileno. En las anastomosis dehiscentes al no conseguir un aumento de presión por la fuga continua del suero ésta es la máxima presión que se puede alcanzar, por lo que la consideramos la PR.

El patrón gráfico de ruptura de las anastomosis

Hemos comprobado como existen dos patrones de ruptura de las anastomosis bien diferenciados: el de estallido y el de fuga (Figuras 23 y 24). Todas las piezas cólicas analizadas al cuarto día postoperatorio fugaron por la anastomosis, pero con

distinto patrón. La mayoría de las anastomosis que tenían un alto índice de adherencias lo hicieron con patrón de estallido, mientras que las que tenían menos adherencias rompieron con un patrón predominante de fuga. Este hallazgo se comprobó tanto en las anastomosis cólicas simples como en las críticas.

Este fenómeno de patrón de estallido asociado a más adherencias y patrón de fuga asociado a menos, podría explicarse por la presencia de “puntos débiles” en la línea anastomótica cuando no está recubierta por completo por adherencias o estructuras de la cavidad abdominal. Al aumentar la presión dentro del colon estos “puntos débiles” serían por los que cedería la anastomosis y por los que se perdería la presión progresivamente por la fuga del suero teñido. Sin embargo, en las anastomosis con más adherencias no existirían estos “puntos débiles” y la anastomosis rompería por varios puntos a la vez, descendiendo la presión bruscamente por pérdida masiva del suero teñido. No se ha encontrado una correlación uniforme entre la presión de ruptura y el patrón gráfico de la ruptura.

La evolución de las anastomosis en el estudio histológico

El patrón inflamatorio encontrado durante el postoperatorio de la cirugía cólica ha ido variando a lo largo del tiempo, pero ha sido constante en todas las muestras del mismo grupo. Aunque no sabemos si con otra forma de medir la inflamación más sensible y específica hubiéramos encontrado diferencias entre las anastomosis con biosuturas y las anastomosis convencionales, esta forma de valorar la inflamación de las anastomosis nos ha resultado muy interesante en lo que respecta a la evolución que han seguido.

Hay tres puntos que nos gustaría destacar: el primero es que la inflamación encontrada al cuarto y séptimo día postoperatorio fue de tipo agudo. Sólo a partir del

decimocuarto día postoperatorio encontramos inflamación crónica. El segundo, que los granulomas debidos al hilo de sutura en las anastomosis cólicas aparecieron a partir del séptimo día postoperatorio (al cuarto día no se encontró ninguno) y aumentaron a lo largo del tiempo hasta hacerse abundantes al vigésimoprimer día postoperatorio. Y el tercero es que hasta el vigésimoprimer día postoperatorio no apareció fibrosis cicatricial en ninguna de las muestras analizadas.

Con todos los datos recogidos en esta variable, el análisis histológico de las piezas con hematoxilina-eosina, vemos como la anastomosis cólica en la rata evoluciona. Al cuarto día postoperatorio predomina una inflamación aguda intensa: predominan los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y un abundante tejido de granulación constituido por vasos neoformados, fibroblastos, macrófagos, células plasmáticas y eosinófilos). Esta inflamación se hace moderada al día 14 y leve al día 21. A partir de la segunda semana la inflamación pasa de aguda a crónica (leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos). No se encuentran granulomas al hilo de sutura hasta el día 7, y éstos van aumentando progresivamente en número hasta ser abundantes en todas las muestras al vigésimoprimer día postoperatorio. La fibrosis medida de esta forma no se hace patente hasta la tercera semana del postoperatorio (Tabla 13).

Anastomosis	Inflamación		Granulomas	Fibrosis
4º día	Aguda	Moderada/intensa (4) Intensa (4)	NO	NO
7º día		Moderada (2) Moderada/Intensa (1) Intensa (7)	Abundantes (1) Escasos (9)	
14º día	Crónica	Leve (1) Moderada (8) Intensa (1)	Escasos (4) Abundantes (4)	
21º día		Leve (7) Moderada (3)	Escasos (2) Abundantes (8)	SI

Tabla 13. Resumen del patrón histológico encontrado en las anastomosis simples.

Anastomosis clasificadas según el día postoperatorio al que se analizan, Inflamación: tipo e intensidad (número de animales), Granulomas: presencia de granulomas y cantidad: abundantes, escasos (número de animales), Fibrosis: presencia de fibrosis SI/NO (en todos los animales de ese grupo).

Modelo de anastomosis críticas

Tras comprobar que las anastomosis con biosuturas tenían una resistencia parecida a las anastomosis con hilos convencionales, pero con un índice de adherencias menor, decidimos ver cual era su efecto en anastomosis sin adherencias. Para lograr este tipo de anastomosis sin adherencias, que denominamos críticas, se establecieron los dos modelos: el recubrimiento con lámina de látex y la inyección de icodextrina 4% intraperitoneal.

El modelo de anastomosis críticas realizado mediante la colocación de una lámina de látex que recubre la anastomosis cólica resultó tener una mortalidad muy elevada, por lo que no creemos que pueda considerarse un buen modelo para nuestro objetivo.

La presencia de un cuerpo extraño fue la única variable introducida distinta al resto de ratas operadas con el mismo método, así que parece razonable pensar que este fue el motivo de la alta tasa de mortalidad. Además, aunque intentamos que el material utilizado, la lámina de látex, tuviera la mínima dimensión posible como para cubrir la anastomosis pero no alterar demasiado las condiciones en la cavidad peritoneal, lo cierto es que nos encontramos con una gran cantidad de adherencias desde todas las superficies hacia la cara superficial del látex. Si bien las condiciones locales de las anastomosis recubiertas eran las que buscábamos, no había adherencias, la alta tasa de mortalidad global en este grupo y la gran cantidad de adherencias presentes en el abdomen nos hicieron buscar otra forma de conseguir una anastomosis crítica con menos efectos adversos.

Usamos icodextrina 4% intraperitoneal para disminuir las adherencias peritoneales, un agente que se utiliza en cirugía abdominal en el humano. Primero comprobamos que el modelo era válido y que la icodextrina disminuía las adherencias y

empeoraba la calidad de las anastomosis al disminuir su resistencia (modelo 2.1). Una vez conseguido el modelo de anastomosis crítica comparamos las biosuturas con los hilos convencionales (modelo 2.2).

El modelo 2.1 con icodextrina al 4% supuso una nueva confirmación de la teoría de que con menos adherencias peritoneales las anastomosis cólicas presentan menor resistencia. Este efecto, que no se demostró en los ensayos preclínicos en los que se probaron barreras físicas como las membranas de ácido hialurónico-carboximetilcelulosa para disminuir las adherencias, pero que sí parece intuirse en los ensayos clínicos en humanos, sí que se ha corroborado en el caso de la icodextrina al 4% en el modelo animal propuesto. Los dos productos, el ácido hialurónico-carboximetilcelulosa y la icodextrina 4%, han demostrado ser de gran utilidad para disminuir las adherencias postoperatorias, sin embargo, con los datos obtenidos, creemos que debe replantearse su utilización cuando hay una anastomosis intestinal intraperitoneal.

Anastomosis críticas y biosuturas

Al introducir células madre mediante el hilo de sutura en anastomosis cólicas sin adherencias, éstas tuvieron una menor incidencia de dehiscencias y una mayor resistencia. Cuando comparamos las anastomosis realizadas en un entorno sin adherencias con células y sin células madre (modelo 2.2) esta tendencia no resultó estadísticamente significativa. Al realizar las comparaciones agrupadas con el fin de optimizar los experimentos de que disponíamos, y por motivos éticos en el uso de animales, sí que aparecen diferencias estadísticamente significativas en tres variables. La primera de ellas es la presión de ruptura: un parámetro de resistencia. La participación de las células madre en el proceso de cicatrización de las anastomosis

mejoró la calidad de las mismas al aumentar la presión de ruptura al cuarto día postoperatorio. Como se ha comentado, el período crítico de aparición de dehiscencias en cirugía digestiva comprende del tercer al quinto día postoperatorio y el aumento en la presión de ruptura logrado con las células madre al cuarto día podría disminuir el índice de dehiscencias tras la cirugía. Esto supondría un avance importante en la clínica, al poder ofrecer mayor seguridad a los pacientes.

Otra variable en la que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos fue el radio de la anastomosis. Sorprendentemente, partiendo de animales de peso homogéneo, que en principio tienen un diámetro de colon parecido, encontramos que las anastomosis en las que había células madre tenían un radio mayor que en las que no había. Esta diferencia de calibre al cuarto día postoperatorio podría corresponder a una menor inflamación local. El efecto inmunomodulador adjudicado a las células madre podría explicar este hallazgo, aunque nosotros no hemos sido capaces de objetivarlo con el estudio histológico de las piezas. De hecho, en el grupo de anastomosis estándar realizadas con biosuturas el radio también fue ligeramente superior y además no hubo casos de obstrucción al cuarto día postoperatorio, consecuencia lógica del aumento de perímetro de las anastomosis. Ésta podría ser una ventaja importante al aportar células madre: menor índice de obstrucción al cuarto día postoperatorio por disminución en la inflamación local. Además, una menor inflamación precoz podría conducir a una menor fibrosis posterior y consecuentemente a menor índice de estenosis postoperatorias. Sin embargo, sería necesario planear un experimento a largo plazo y con un gran número de animales para comprobar esto último.

La última variable diferente entre las anastomosis con biosuturas y las convencionales, de forma estadísticamente significativa, es la tensión de ruptura.

Aunque está relacionada también con la resistencia de las anastomosis no es una medida habitual en los estudios de calidad de anastomosis, pero puede resultar interesante cuando se parte de animales de peso variable, en los que el perímetro del colon puede ser diferente. Nosotros obviamos este problema al seleccionar los animales de peso parecido (mayores de 250 g, y por lo tanto, de tamaño de colon similar) con el objetivo de dar seis puntos en todas las anastomosis y que cada biosutura sólo se usara en dos puntos. En nuestro caso la tensión de ruptura ha confirmado la tendencia de la presión de ruptura en todo momento.

Los resultados que hemos presentado nos hacen pensar que las biosuturas pueden ser de utilidad en anastomosis de alto riesgo, si bien su uso de rutina no estaría justificado por el momento con los resultados obtenidos en las anastomosis cólicas simples.

Sería interesante confirmar también el efecto de los hilos recubiertos de células madre en otro tipo de anastomosis digestivas de alto riesgo, como las esofágicas, e incluso comprobar su efecto en la cicatrización de suturas no digestivas con riesgo de dehiscencia, como las bronquiales. Asimismo, el efecto inmunomodulador de las células madre y los resultados obtenidos en cicatrización de fístulas perianales y enterocutáneas en pacientes con Enfermedad de Crohn nos hacen pensar que las biosuturas podrían mejorar los resultados quirúrgicos de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal

209, 212.

RESUMEN

Introducción

Las dehiscencias en cirugía colorrectal

En la cirugía del aparato digestivo la cicatrización de las anastomosis determina el éxito de la intervención quirúrgica. En cirugía colorrectal la aproximación de los bordes de resección en las mejores condiciones de vascularización y sin tensión resulta imprescindible, pero, a pesar de realizar una correcta técnica quirúrgica, en un 1- 39% de los casos, según las series, aparecerán dehiscencias y fugas anastomóticas. En la cirugía del cáncer de recto la incidencia de dehiscencia tras resección anterior baja se encuentra alrededor del 10%. Las anastomosis de los segmentos extraperitoneales del tubo digestivo (esófago y recto) se consideran críticas, tanto por su elevada incidencia de dehiscencias como por la mayor mortalidad asociada a las mismas.

Las anastomosis colorrectales tienen un período crítico de aparición de dehiscencias y fugas anastomóticas entre el tercer y el quinto día postoperatorio, que coincide con la fase de menos resistencia de la sutura. En estos días existe una disminución en la cantidad de colágeno de la submucosa cólica y una pobre respuesta vascular, y éstas parecen ser las causas de la menor fuerza anastomótica.

El tipo de técnica de utilizada en la realización de las anastomosis no parece influir en el resultado de las mismas, medido como aparición de dehiscencias. En cirugía colorrectal no se encuentran diferencias en el índice de dehiscencias entre las anastomosis mecánicas y las manuales, aunque la práctica de una sutura mecánica se asocia a mayor riesgo de estenosis y la sutura manual a mayor tiempo quirúrgico. Tampoco hay diferencias entre las suturas manuales monoplaneo frente a las biplaneo ni entre las suturas látero-laterales, látero-terminales, término-laterales o término-

terminales en este aspecto. Tan sólo se encuentra una ligera ventaja en anastomosis del tipo látero-laterales mecánicas en pacientes con enfermedad de Crohn en términos de dehiscencia y recidiva anastomótica.

Las adherencias peritoneales

Las adherencias peritoneales se producen como consecuencia de la agresión quirúrgica sobre el peritoneo. La hemorragia y la liberación de proteínas plasmáticas conducen al depósito de puentes de fibrina entre las superficies lesionadas. Si estos puentes de fibrina no son degradados precozmente darán lugar a estructuras de tejido conectivo de mayor resistencia por la invasión de fibroblastos productores de colágeno. Desde este momento se considera que la adherencia es irreversible.

Las adherencias locales formadas alrededor de una anastomosis le confieren resistencia, sin embargo, las adherencias generalizadas en la cavidad peritoneal pueden causar a largo plazo obstrucción intestinal, infertilidad y dolor pélvico crónico. La obstrucción intestinal es la consecuencia más grave y frecuente de las adherencias.

Se han definido tres métodos para intentar disminuir las adherencias basándose en la fisiopatología de su aparición: 1) disminuir la actividad inflamatoria, 2) facilitar la degradación de la fibrina con agentes estimuladores de la fibrinólisis y 3) separar las superficies abdominales durante los días en que la fibrina puede unir las. Los posibles efectos secundarios de los dos primeros han hecho que el tercer método sea el que más se haya estudiado. Existen numerosos compuestos antiadherenciales en desarrollo, uno de ellos es la icodextrina 4% (Adept®). Es un polímero de glucosa cuyo objetivo es mantener las superficies peritoneales separadas durante los primeros días del postoperatorio al formar una barrera líquida entre ellas, mecanismo que se conoce como hidroflotación. La utilización de estas barreras antiadherenciales cuando se lleva a

cabo una anastomosis digestiva es controvertida, ya que en algunos estudios se ha encontrado una incidencia muy elevada de dehiscencias.

Las células madre

El término célula madre (*stem cell*) se utiliza para definir una célula indiferenciada que tiene dos propiedades: la autorregeneración y la capacidad de dar lugar a diferentes líneas de células especializadas. Este tipo de células están en el embrión en estadio de blastocisto (células madre embrionarias) y en los tejidos adultos (células madre adultas). Las células madre adultas son pluripotenciales, porque pueden dar lugar a células derivadas de las tres capas embrionarias: endodermo, ectodermo y mesodermo. Esta capacidad de transdiferenciación es la que ha hecho que se estudie ampliamente su uso en los procesos de regeneración y cicatrización de tejidos. El trasplante de células vivas con el fin de curar o mejorar un determinado proceso, es decir, con fines terapéuticos, es lo que se ha denominado Terapia Celular. En la actualidad hay más de 500 ensayos clínicos en el mundo en los que se están utilizando células madre en diferentes líneas de investigación: las enfermedades hematológicas, la reparación miocárdica, las enfermedades neurodegenerativas...

Hipótesis de trabajo

La intención de disminuir el número de dehiscencias anastomóticas cólicas mediante el empleo de células madre que mejoren la cicatrización, nos hizo pensar que el mejor método de aplicación podría ser el propio hilo de sutura.

Planteamos un experimento en anastomosis cólicas en ratas en el que comparamos las anastomosis colo-cólicas realizadas con hilos de sutura (Polyglactin-910) recubiertos de células madre derivadas de tejido adiposo, con anastomosis

realizadas con hilos convencionales (Polyglactin-910), a diversos periodos de tiempo postoperatorio (4°, 7°, 14° y 21° día postoperatorio). A esta sutura con células madre la denominamos “biosutura”.

En un segundo tiempo comprobamos el efecto de las biosuturas en anastomosis cólicas en un entorno sin adherencias, porque pensamos que podrían contribuir a mejorar los resultados de este tipo de anastomosis digestivas consideradas críticas. Para evitar la formación de adherencias peritoneales postoperatorias planteamos dos modelos. En el primero recubrimos una anastomosis colo-cólica con una lámina de látex (frena la formación de adherencias alrededor de la línea de sutura y empeora la cicatrización) y en el segundo dejamos la anastomosis colo-cólica en un baño de icodextrina al 4% intraperitoneal. Ambos modelos se evalúan al cuarto día postoperatorio.

Material y método

Se usaron noventa y tres ratas: ochenta y tres ejemplares adultos de rata BDIX y diez ejemplares adultos de rata Sprague-Dawley. De dos ejemplares de rata BDIX se extrajo tejido adiposo subdérmico para obtener células madre mesenquimales, 40 ratas BDIX se emplearon para la realización de anastomosis cólicas estándar, 19 ratas BDIX en el modelo de anastomosis crítica con lámina de látex, 10 ratas Sprague-Dawley en el modelo de anastomosis crítica con icodextrina al 4 % y 22 ratas BDIX en el modelo de anastomosis crítica con icodextrina 4% y biosuturas.

La obtención de células madre del tejido adiposo subdérmico se lleva a cabo mediante corte del tejido, digestión con collagenasa tipo I y centrifugación. Una vez obtenidas las células éstas se cultivan y posteriormente se modifican para que expresen

GFP. La carga celular de los hilos se realiza en 30 horas, colocando el Polyglactin-910 de 30 cm en placas de baja adhesión sobre una plataforma oscilante.

Las variables que se midieron fueron: 1. Dehiscencia, 2. Dilatación, 3. Obstrucción, 4. Adherencias generales, 5. Grado de separación de las adherencias, 6. Adherencias a la anastomosis, 7. Estructuras adheridas, 8. Índice de adherencias, 9. Presión de ruptura, 10. Punto de ruptura, 11. Radio de la anastomosis, 12. Tensión de ruptura, 13. Examen histológico, 14. Identificación de células GFP positivas.

Se utiliza el test de Chi cuadrado para comparar las variables dehiscencia, dilatación, obstrucción, inflamación, granulomas y fibrosis. Para comparar el índice de adherencias, la presión de ruptura, el radio y la tensión de ruptura se usa el test U de Mann-Whitney. Un valor de p menor de 0,05 se considera estadísticamente significativo.

Resultados

Anastomosis cólicas estándar

- Grupo 4º día postoperatorio: dos ratas se excluyeron del estudio por problemas de técnica. No hubo casos de dehiscencia. El índice de adherencias fue menor en el grupo de biosuturas [5,75 (DS \pm 1,5)] respecto al grupo control [9 (DS \pm 0,81)] de forma estadísticamente significativa (p 0,02). La media de la presión de ruptura en el grupo de biosuturas con fue 46,15 mmHg (DS \pm 11,62) y en el grupo de suturas convencionales 44,73 mmHg (DS \pm 13,57). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 0,77).

- Grupo 7º día postoperatorio: No hubo dehiscencias en ningún grupo. La media del índice de adherencias del grupo de hilos con células fue 6,2 (DS \pm 0,44) y en grupo de hilos convencionales fue 8,6 (DS \pm 0,89). Sí que se encontraron diferencias

estadísticamente significativas entre ambos grupos (p 0,006). La media de la presión de ruptura en el grupo de anastomosis con biosuturas fue 123,53 mm Hg (DS \pm 10,98) y en el grupo de anastomosis con hilos simples 115,59 mm Hg (DS \pm 12,87). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos (p 0,209).

- Grupo 14° día postoperatorio: en ningún caso hubo dehiscencia anastomótica. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en el índice de adherencias (p 0,26) ni en la presión de ruptura (p 0,53). IA grupo de biosuturas 5,60 (DS \pm 1,34), IA grupo de hilos convencionales 6,60 (DS \pm 1,51). La presión de ruptura en el grupo de biosuturas fue 96,44 mm Hg (DS \pm 13,77) y en el grupo de hilos normales 101,74 mm Hg (DS \pm 8,9).

- Grupo 21° día postoperatorio: no se encontraron dehiscencias anastomóticas en ningún ejemplar. Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas entre el índice de adherencias [4,80 (DS \pm 1,78) en biosuturas frente a 5,60 (DS \pm 1,51), (p 0,52)] ni entre la presión de ruptura de ambos grupos [104,48 mm Hg (DS \pm 15,53) en biosuturas y 120,61 mm Hg (DS \pm 13,72) en hilos convencionales, (p 0,17)].

Anastomosis cólicas críticas

- Modelo 1: recubrimiento de la anastomosis con lámina de látex: seis animales fallecieron antes del cuarto día postoperatorio sin que se evidenciara dehiscencia anastomótica (mortalidad 31,57 %). No hubo dehiscencias anastomóticas ni se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el índice de adherencias (p 0,14) ni la presión de ruptura (p 0,77) de ambos grupos. Índice de adherencias 8,28 (DS 0,51) en biosuturas y 8,83 (DS 0,75) en hilos convencionales. Presión de ruptura 29,27 mm Hg (DS 21,56) en biosuturas y 26,92 mm Hg (DS 20,49) en hilos convencionales.

- Modelo 2.1.: anastomosis en icodextrina 4%: dos animales tratados con icodextrina presentaron dehiscencia anastomótica. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en el índice de adherencias (p 0,02), 3,67 (DS 1,15) en icodextrina y 9 (DS 0,7) en el grupo control. La presión de ruptura del grupo con icodextrina fue 17,76 mm Hg (DS 18,95) y la media del grupo control 39,18 mm Hg (DS 17,16). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 0,07).

- Modelo 2.2.: anastomosis en icodextrina 4% y suturas recubiertas con células madre: de los animales analizados (doce se excluyeron por bajo peso) hubo dehiscencia de una anastomosis realizada con hilos convencionales (p 0,4). La media del índice de adherencias en el grupo de biosuturas fue 5,66 (DS 1,63) y en el otro grupo 6,33 (DS 2,08). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 0,59). La media de la presión de ruptura en el grupo de anastomosis con biosuturas fue 62,96 mmHg (DS 14,83) y en el grupo de suturas convencionales 25,12 mmHg (DS 28,33). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 0,08).

Al comparar todas las anastomosis críticas por icodextrina 4% realizadas con biosuturas (modelo 2.1) con todas las anastomosis críticas por icodextrina 4% realizadas con hilos convencionales (modelo 2.1 y 2.2) obtuvimos los siguientes resultados:

-Hubo tres dehiscencias en el grupo de anastomosis críticas control. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p 0,22).

- El Índice de Adherencias medio del grupo de anastomosis con hilos con células madre fue 5,66 (DS 1,63) y el del grupo de anastomosis control 5 (DS 2,09). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos (p 0,465).

- La presión de ruptura del grupo de biosuturas fue 62,96 mm Hg (DS 14,83) y la del grupo de anastomosis con hilos convencionales 21,03 mm Hg (DS 21,76). Sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos (p 0,006).

Discusión

Con el objetivo de mejorar la cicatrización cólica y disminuir las dehiscencias postoperatorias hemos aplicado células madre en las anastomosis de colon de un modelo experimental en rata. El hilo de sutura ha resultado ser un buen vehículo para las células, que se han adherido a su superficie tapizándolo por completo.

En nuestro modelo, la aplicación de biosuturas en anastomosis cólicas estándar redujo la formación de adherencias peritoneales al cuarto y séptimo día postoperatorio, sin que esto redundara en una disminución de la resistencia de las anastomosis cólicas.

En el modelo de anastomosis cólicas sin adherencias mediante la aplicación de una lámina de látex que recubre la anastomosis (Modelo 1), la mortalidad fue muy elevada (31,57 %), sin que ésta se debiera a dehiscencia anastomótica. Como la lámina de látex fue el único factor diferente que se introdujo en este grupo, creemos que la mortalidad se debió a dejar un cuerpo extraño intraabdominal.

Al utilizar la icodextrina 4% intraperitoneal obtuvimos un modelo de anastomosis de baja resistencia por disminución de las adherencias peritoneales (Modelo 2.1.), lo que nosotros denominamos anastomosis críticas. Estas anastomosis corresponderían a segmentos del tubo digestivo extraperitoneales, en los que no es posible la formación de adherencias ni la actuación del epiplon. La aplicación de biosuturas en anastomosis críticas por icodextrina proporcionó mayor resistencia a las anastomosis. En el análisis de modelos agrupados la utilización de biosuturas en este

tipo de anastomosis críticas mejoró su resistencia de forma estadísticamente significativa.

En conclusión, las biosuturas disminuyeron las adherencias peritoneales de las anastomosis cólicas estándar al cuarto y séptimo día postoperatorio, y mejoraron la resistencia de las anastomosis críticas al cuarto día postoperatorio.

CONCLUSIONES

1. Es posible recubrir el material de sutura con células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo sin perder la manejabilidad del mismo.
2. El fenómeno adherencial observado al usar biosuturas es inferior que al usar hilos convencionales de forma estadísticamente significativa al cuarto y séptimo día postoperatorio en anastomosis cólicas simples.
3. A pesar del menor fenómeno adherencial encontrado en el caso de las anastomosis realizadas con biosuturas, no existen diferencias estadísticamente significativas en la resistencia de los dos tipos de anastomosis.
4. La disminución de las adherencias peritoneales por el uso de icodextrina 4% (anastomosis crítica) produjo una disminución de la resistencia de las anastomosis y un mayor número de dehiscencias.
5. El uso de biosuturas en anastomosis críticas (por icodextrina 4%) disminuyó el número de dehiscencias y proporcionó una mayor resistencia a las anastomosis cólicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Shikata J, Shida T. Effects of tension on local blood flow in experimental intestinal anastomoses. *J Surg Res* 1986; 40: 105-111.
2. Ravo B. Colorectal anastomotic healing and intracolonic bypass procedure. *Surg Clin North Am* 1988; 68: 1267-94.
3. Diccionario de La Real Academia de la Lengua Española. Vigésimasegunda Edición. Madrid: Espasa-Calpe; 2001.
4. García-Olmo D, Paya J, Lucas FJ, García-Olmo DC. The effects of the pharmacological manipulation of postoperative intestinal motility on colonic anastomoses. An experimental study in a rat model. *Int J Colorectal Dis* 1997; 12: 73-77.
5. García-Olmo, Lucas FJ, Paya J. Effect of an intrabdominal latex (drain-like) tube on anastomotic resistance and adhesion formation in a rat model. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 311-317.
6. Wise L, McAlister W, Stein T, Schuck P. Studies on the healing of anastomoses of small and large intestines. *Surg Gynecol Obstet* 1975; 141: 190-194.
7. Thornton FJ, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. *Surg Clin North Am* 1997; 77: 549-573.
8. Gabella G, Yamey A. Synthesis of collagen by smooth muscle in the hypertrophic intestine. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 1977; 62: 257-264.

9. Gabella G. The cross-ply arrangement of collagen fibres in the submucosa of the mammalian small intestine. *Cell Tissue Res* 1987; 248: 491-497.
10. Ellison GW. Wound healing in the gastrointestinal tract. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1989; 4: 287-293.
11. DiZerega GS. The peritoneum and its response to surgical injury. *Prog Clin Biol Res* 1990; 358: 1-11.
12. Goligher JC, Graham NG, De Dombal FT. Anastomotic dehiscence after anterior resection of rectum and sigmoid. *Br J Surg* 1970; 57: 109-118.
13. Cui Y, Urschel JD. Esophagogastric anastomotic wound healing in rats. *Dis Esophagus* 1999; 12:1 49-151.
14. Szpaderska A, DiPietro L. Inflammation in surgical wound healing: friend or foe?. *Surgery* 2005; 137: 571-573.
15. Cronin K, Jackson DS, Dunphy JE. Changing bursting strength and collagen content of the healing colon. *Surg Gynecol Obstet* 1968; 126: 747.
16. Graham MF, Drucker DE, Diegelmann RF, Elson CO. Collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells in culture. *Gastroenterology* 1987; 92: 400-405.
17. Martens MF, Huyben CM, Hendriks T. Collagen synthesis in fibroblasts from human colon: regulatory aspects and differences with skin fibroblasts. *Gut* 1992; 33: 1664-1670.

18. Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg* 2001; 38: 72-140.
19. Mansson P, Zhang XW, Jeppsson B, Thorlacius H. Anastomotic healing in the rat colon: comparison between a radiological method, breaking strength and bursting pressure. *Int J Colorectal Dis* 2002; 17: 420-425.
20. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Inflamación y reparación. En: Robbins. *Patología estructural y funcional*. Madrid. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. 1995: 57-105.
21. Méndez Martín JJ. Evolución y cicatrización de las heridas. En: Rodríguez-Montes JA, editor. *Materiales de sutura en cirugía*. Madrid: Ed. Scientific Communication Management, S.L; 2004. p. 1-33.
22. Hawley PR. Causes and prevention of colonic anastomotic breakdown. *Dis Colon Rectum* 1973; 16: 272-277.
23. Hawley PR, Faulk WP, Hunt TK, Dunphy JE. Collagenase activity in the gastrointestinal tract. *Br J Surg* 1970; 57(12): 896-900.
24. Hunt TK, Hawley PR. Surgical judgment and colonic anastomoses. *Dis Colon Rectum* 1969; 12: 167-171.
25. Adams W, Ctercteko G, Bilous M. Effect of an omental wrap on the healing and vascularity of compromised intestinal anastomoses. *Dis Colon Rectum* 1992; 35: 731-738.

26. García Olmo D, Lucas FJ, Paya J. Relationship between peritoneal adhesion and the experimental resistance of colonic anastomoses: influence of omentoplasty. *Eur Surg Res* 1996; 4: 315-322.
27. Carlson MA. Acute wound failure. *Surg Clin North Am* 1997; 77: 607-636.
28. Shandall A, Lowndes R, Young HL. Colonic anastomotic healing and oxygen tension. *Br J Surg* 1985; 72: 606-609.
29. Thompson SK, Chang EY, Jobe BA. Clinical review: Healing in gastrointestinal anastomoses, part I. *Microsurgery* 2006; 26:131-136.
30. Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg* 2001; 38: 72-140.
31. Bruce J, Krukowski ZH, Russell EM, Park KGM. Systematic review of the definition and measurement of anastomotic leak after gastrointestinal surgery. *Br J Surg* 2001; 88: 1157-1168.
32. Vignali A, Fazio VW, Lavery IC et al. Factors associated with the occurrence of leaks in stapled rectal anastomoses: a review of 1.014 patients. *J Am Coll Surg* 1997; 185: 105-113.
33. Alberts JCJ, Parvaiz A, Moran BJ. Predicting risk and diminishing the consequences of anastomotic dehiscence following rectal resection. *Colorect Dis* 2003; 5: 478-482.
34. Eriksen MT, Wibe A, Norstein J, Haffner J, Wiig JN. Anastomotic leakage following routine mesorectal excision for rectal cancer in a national cohort of patients. *Colorect Dis* 2005; 7: 51-57.

35. Tersigni R, Alessandrini L, Baiano G, Cavallaro G, Palmieri I, Pantano F, Tremiteira S. Anastomosis dehiscence in anterior resection of the rectum with total excision of the mesorectum. *Chir Ital* 2002; 54: 179-184.
36. Matthiessen P, Hallbook O, Andersson M, Rutegard J, Sjodahl R. Risk factors for anastomotic leakage after anterior resection of the rectum. *Colorectal Dis* 2004; 6: 462-469.
37. Law WL, Chu KW. Anterior resection for rectal cancer with mesorectal excision: a prospective evaluation of 622 patients. *Ann Surg* 2004; 240: 260-268.
38. Rullier E, Laurent C, Garrelon JL, Michel P, Saric J, Parneix M. Risk factors for anastomotic leakage after resection of rectal cancer. *Br J Surg* 1998; 85: 355-358.
39. Law WI, Chu KW, Ho JW, Chan CW. Risk factors for anastomotic leakage after low anterior resection with total mesorectal excision. *Am J Surg* 2000; 179: 92-96.
40. Vara Thorbeck. El problema de las anastomosis del tracto digestivo. En: Rodríguez-Montes JA, editor. *Materiales de sutura en cirugía* Madrid: Ed. Scientific Communication Management, S.L; 2004. p. 187-197.
41. Picardi N. History of mechanical sutures in digestive system surgery. *Ann Ital Chir* 2002; 73: 1-10.
42. Mc Guire J, Wright IC, Leverment JN. Surgical staplers: a review. *J R Coll Surg Edinb* 1997; 42: 1-9.
43. Moran BJ. Stapling instruments for intestinal anastomosis in colorectal surgery. *Br J Surg* 1996; 83: 902-909.

44. Mac Rae HM, McLeod RS. Handsewn vs. Stapled anastomoses in colon and rectal surgery: a meta-analysis. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 180-189.
45. Lustosa SA, Matos D, Atallah AN, Castro AA. Stapled versus handsewn anastomosis for colorectal anastomosis surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2001; (3): CD003144.
46. Lustosa SA, Matos D, Atallah AN, Castro AA. Stapled versus handsewn anastomosis for colorectal anastomosis surgery: a systematic review of randomized controlled trials. *Sao Paulo Med J* 2002; 120: 132-136.
47. Nockemann PF. Ramdohr invagination operation and its significance for development of intestinal suture technique *Chirurg* 2000; 71: 1296-300.
48. Hardy KJ. A view of the development of intestinal suture. Part II. Principles and techniques. *Aust N Z J Surg* 1990; 60: 377-384.
49. Lafreniere R, Ketchan AS. A single layer open anastomosis for all intestinal structures. *Am J Surg* 1985; 149: 797-798.
50. Wheelless CR Jr. The Gambee intestinal anastomosis in gynecologic surgery. *Obstet Gynecol* 1975; 46: 448-452.
51. Gambee LP, Garnjobst W, Hardwick CE. Ten years' experience with a single-layer anastomosis in colon surgery. *Am J Surg* 1956; 92: 222-227.
52. Bronwell AW, Rutledge R, Dalton ML. Single-layer open gastrointestinal anastomosis. *Ann Surg* 1967; 165: 925-932.

53. Hatefeuille P. Reflexions sur les sutures digestives: a propos de 570 sutures accomplies depuis 5 ans au surjet monoplan de monobrin. *Chirurgie* 1976; 102: 153-165.
54. Buch JM. Injury to the colon and rectum. En: Mattox KL, Moore EE editores. *Trauma*. Nueva York: Mc Graw-Hill; 2000.
55. Dietz UA, Debus ES. Intestinal anastomoses prior to 1882; a legacy of ingenuity, persistence and research form a foundation for modern gastrointestinal surgery. *World J Surg* 2005; 29: 396-401.
56. Vara Thorbeck, R. La influencia de la Escuela Alemana en el desarrollo de la cirugía moderna. En: Rodríguez Montes JA, editor. *Historias de la Cirugía*. Madrid: Ergon; 2003. p. 301-314.
57. Shikata S, Yamagishi H, Taji Y, Shimada T, Noguchi Y. Single versus two-layer intestinal anastomosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Surg* 2006; 6: 2-2.
58. Burch JM, Franciose RJ, Moore EE, Biffl WL, Offner PJ. Single-layer continuous versus two-layer interrupted intestinal anastomosis: a prospective randomized trial. *Ann Surg* 2000; 231: 832-837.
59. Thomson WH, Robinson MH. One-layer continuously sutured colonic anastomosis. *Br J Surg* 1993; 80: 1450-1451.
60. Max E, Sweeney WB, Bailey HR, Oommen SC, Butts DR, Smith KW, Zamora LF, Skakun GB. Results of 1,000 single-layer continuous polypropylene intestinal anastomoses. *Am J Surg* 1991; 162: 461-467.

61. Sarin S, Lightwood RG. Continuous single-layer gastrointestinal anastomosis: a prospective audit. *Br J Surg* 1989; 76: 493-495.
62. Harder F, Vogelbach P. Single-layer end-on continuous suture of colonic anastomoses. *Am J Surg* 1988; 155: 611-614.
63. Steichen FM. Sutura mecánica en las operaciones del tracto gastrointestinal. En: Nyhus LLM, Baker RJ, Fischer JE editores. *El dominio de la cirugía*. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1999. p. 221-246.
64. Resegotti A, Astegiano M, Farina EC, Ciccone G, Avagnina G, Giustetto A, Campra D, Fronda GR. Side-to-side stapled anastomosis strongly reduces anastomotic leak rates in Crohn's disease surgery. *Dis Colon Rectum*. 2005; 48: 464-468.
65. Scarpa M, Angriman I, Barollo M, Polese L et al. Role of stapled and hand-sewn anastomoses in recurrence of Crohn's disease. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1053-1057.
66. DiZerega GS, Campeau JD. Peritoneal repair and post-surgical adhesion formation. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 547-555.
67. Menzies D, Parker M, Hoare R, Knight A. Small bowel obstruction due to postoperative adhesions: treatment patterns and associated costs in 110 hospital admissions. *Ann R Coll Surg Engl* 2001; 83: 40-46.
68. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiología médica*. Madrid: Ed. Mc Graw Hill-Interamericana; 1996. p. 505- 515.

69. Holmdahl L, Eriksson E, al-Jabreen M, Risberg B. Fibrinolysis in human peritoneum during operation. *Surgery* 1996; 119: 701-5.
70. Vipond MN, Whawell SA, Thompson JN, Dudley HA. Peritoneal fibrinolytic activity and intra-abdominal adhesions. *Lancet* 1990; 335: 1120- 1122.
71. Herrick SE, Mutsaers SE. Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 621-642.
72. Reijnen M, Holmdahl L, Kooistra T, Falk P, Hendriks T, van Goor H. Time course of peritoneal tissue plasminogen activator after experimental colonic surgery: effect of hyaluronan-based antiadhesive agents and bacterial peritonitis. *Br J Surg* 2002; 89: 103-109.
73. Diamond MP, El-Hammady E, Wang R, Saed G. Metabolic regulation of collagen I in fibroblasts isolated from normal peritoneum and adhesions by dichloroacetic acid. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 1456-1460.
74. Saed GM, Diamond MP. Molecular characterization of postoperative adhesions: the adhesion phenotype. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2004; 11: 307-314.
75. Saed GM, Diamond MP. Differential expression of alpha smooth muscle cell actin in human fibroblasts isolated from intraperitoneal adhesions and normal peritoneal tissues. *Fertil Steril* 2004; 82: 1188-1192.
76. Saed GM, Diamond MP. Modulation of the expression of tissue plasminogen activator and its inhibitor by hypoxia in human peritoneal and adhesion fibroblasts. *Fertil Steril* 2003; 79: 164-168.

77. Saed GM, Munkarah AR, Diamon MP. Cyclooxygenase-2 is expressed in human fibroblasts from intraperitoneal adhesions but not from normal peritoneal tissues. *Fertil Steril* 2003; 79: 1404-1408.
78. Lucas Imbernon FJ. Correlación entre el fenómeno adherencial y la resistencia de las anastomosis cólicas. Estudio experimental en la rata [Tesis doctoral]. Madrid: Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid; 1994.
79. Beck DE, Opelka FG, Bailey HR, Rauh SM, Pashos CL. Incidence of small-bowel obstruction and adhesiolysis after open colorectal and general surgery. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 241-248.
80. Nieuwenhuijzen M, Reijnen MM, Kuijpers JH, van Goor H. Small bowel obstruction after total or subtotal colectomy: a 10-year retrospective review. *Br J Surg* 1998; 85: 1242-1245.
81. Ryan MD, Wattchow D, Walker M, Hakendorf P. Adhesional small bowel obstruction after colorectal surgery. *ANZ J Surg* 2004; 74: 1010-1012.
82. Wilson MS, Hawkswell J, McCloy RF. Natural history of adhesional small bowel obstruction: counting the cost. *Br J Surg* 1998; 85: 1294-1298.
83. Kossi J, Salminen P, Rantala A, Laato M. Population-based study of the surgical workload and economic impact of bowel obstruction caused by postoperative adhesions. *Br J Surg* 2003; 90: 1441-1444.
84. Ellis H. The clinical significance of adhesions: focus on intestinal obstruction. *Eur J Surg Suppl* 1997; 577: 5-9.

85. Malangoni MA, Times ML, Kozik D, Merlino JJ. Admitting service influences the outcomes of patients with small bowel obstruction. *Surgery* 2001; 130: 706-711.
86. Lower AM, Hawthorn R, Ellis H. The impact of adhesions on hospital readmissions over ten years after 8489 open gynaecological operations: an assessment from the surgical and clinical adhesions research study. *BJOG* 2000; 107: 855-862.
87. Cox MR, Gunn IF, Eastman MC, Hunt RF, Heinz AW. The operative aetiology and types of adhesions causing small bowel obstruction. *Aust N Z J Surg* 1993; 63: 848-852.
88. Miller G, Boman J, Shrier I, Gordon PH. Natural history of patients with adhesive small bowel obstruction. *Br J Surg* 2000; 87: 1240-1247.
89. Kossi J, Salminen P, Laato M. The epidemiology and treatment patterns of postoperative adhesion induced intestinal obstruction in Varsinais-Suomi Hospital District. *Scand J Surg* 2004; 93: 68-72.
90. Diamond MP, Daniell JF, Feste J, Surrey MW, McLaughlin DS, Friedman S, Vaughn WK, Martin DC. Adhesion reformation and de novo adhesion formation after reproductive pelvic surgery. *Fertil Steril* 1987; 47: 864-866.
91. Hiki N, Shimizu N, Yamaguchi H, Imamura K, Kami K, Kubota K, Kaminishi M. Manipulation of the small intestine as a cause of the increased inflammatory response after open compared with laparoscopic surgery. *Br J Surg* 2006; 93: 195-204.

92. Shayani V, Siegert C, Favia P. The role of laparoscopic adhesiolysis in the treatment of patients with chronic abdominal pain or recurrent bowel obstruction. *JSLs* 2002; 6: 111-114.
93. Szomstein S, Lo Menzo E, Simpfendorfer C, Zundel N, Rosenthal RJ. Laparoscopic lysis of adhesions. *World J Surg* 2006; 30: 535-540.
94. Parker JD, Sinaii N, Segars JH, Godoy H, Winkel C, Stratton P. Adhesion formation after laparoscopic excision of endometriosis and lysis of adhesions. *Fertil Steril* 2005; 84: 1457-1461.
95. Wu JM, Lin HF, Chen KH, Tseng LM, Huang SH. Laparoscopic diagnosis and treatment of acute small bowel obstruction resulting from a congenital band. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2005; 15: 294-296.
96. Leon EL, Metzger A, Tsiotos GG, Schlinkert RT, Sarr MG. Laparoscopic management of small bowel obstruction: indications and outcome. *J Gastrointest Surg* 1998; 2: 132-140.
97. Reissman P, Spira RM. Laparoscopy for adhesions. *Semin Laparosc Surg* 2003; 10: 185-190.
98. Sato Y, Ido K, Kumagai M et al. Laparoscopic adhesiolysis for recurrent small bowel obstruction: long-term follow-up. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 476-479.
99. Tsumura H, Ichikawa T, Murakami Y, Sueda T. Laparoscopic adhesiolysis for recurrent postoperative small bowel obstruction. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1058-1061.

100. Tiwari A, Peters JL. Laparoscopic adhesiolysis in patients with chronic abdominal pain. *Lancet* 2003; 361: 1247-1251.
101. Holmdahl L. Making and covering of surgical footprints. *The Lancet* 1999; 353: 1456-1457.
102. Chiang SC, Cheng CH, Moulton KS, et al. TNP-470 inhibits intraabdominal adhesion formation. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 189-196.
103. Greene AK, Alwayn IP, Nose V, Flynn E, Sampson D, Zurakowski D, Folkman J, Puder M. Prevention of intra-abdominal adhesions using the antiangiogenic COX-2 inhibitor celecoxib. *Ann Surg* 2005; 242: 140-146.
104. Greene AK, Puder M. Prevention of intra-abdominal adhesions using the antiangiogenic COX-2 inhibitor celecoxib. *Ann Surg* 2006; 244: 328.
105. García-Olmo DC, Paya J, García-Olmo D. Effects of perioperative treatment with TNP- 470 on the resistance of colonic anastomoses in rats. *Dig Surg* 2000; 2: 154-159.
106. Kutlay J, Ozer Y, Isik B, Kargici H. Comparative effectiveness of several agents for preventing postoperative adhesions. *World J Surg* 2004; 28: 662-665.
107. Dunn RC, Mohler M. Effect of varying days of tissue plasminogen activator therapy on the prevention of postsurgical adhesions in a rabbit model. *J Surg Res* 1993; 54: 242-245.
108. Verco SJ, Peers EM, Brown CB, Rodgers KE, Roda N, DiZerega G. Development of a novel glucose polymer solution (icodextrin) for adhesion prevention: pre-clinical studies. *Hum Reprod.* 2000; 15: 1764-72.
109. DiZerega, Verco SJ, Yong P, Kettel M, Kobak W, Martin D, Sanfilippo J, Peers EM, Scrimgeour A, Brown CB. A randomized, controlled pilot study of

- the safety and efficacy of 4% icodextrin solution in the reduction of adhesions following laparoscopic gynaecological surgery. *Hum Reprod* 2002; 17: 1031-1038.
110. Hosie KB, Gilbert JA, Kerr DJ, Brown CB, Peers EM. Fluid dynamics in man of an intraperitoneal drug delivery solution: 4% icodextrin. *Drug Delivery* 2001; 8: 9-12.
 111. Sprosen TS, Van Bree M, Andry P, Divino Filho JC. European clinical experience with Extraneal (icodextrin 7,5%) in 1314 patients. *Perit Dial Int* 2002; 22: 30.
 112. Hosie KB, Kerr DJ, Gilbert JA et al. A pilot study of adjuvant intraperitoneal 5-fluorouracil using 4% icodextrin as a novel carrier solution. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 254-260.
 113. Van den Tol P, Ten Raa S, Van Grevenstein H, Marquet R, Van Eijck C, Jeekel H. Icodextrin reduces postoperative adhesion formation in rats without affecting peritoneal metastasis. *Surgery* 2005; 137: 348-354.
 114. Tarhan OR, Eroglu A, Cetin R, Y Nce A, Bulbul M, Altuntas YR. Effects of seprafilm on peritoneal fibrinolytic system. *ANZ J Surg* 2005; 75: 690-692.
 115. DeCherney AH, diZerega GS. Clinical problem of intraperitoneal postsurgical adhesion formation following general surgery and the use of adhesion prevention barriers. *Surg Clin North Am* 1997; 77: 671-688.
 116. Remzi FH, Oncel M, Church JM, Senagore AJ, Delaney CP, Fazio VW. An unusual complication after hyaluronate-based bioresorbable membrane (Seprafilm) application. *Am Surg* 2003; 69: 356-357.

117. David M, Sarani B, Moid F, Tabbara S, Orkin BA. Paradoxical inflammatory reaction to Seprafilm: case report and review of the literature. *South Med J* 2005; 98: 1039-1041.
118. Al-Jaroudi D, Tulandi T. Adhesion prevention in gynecologic surgery. *Obstet Gynecol Surv* 2004; 59: 360-367.
119. Ustun C, Kocak I, Akpolat I. Effects of Seprafilm (sodium hyaluronate-based bioresorbable), Sepracoat (0.4% hyaluronic acid), and Ringer's lactate on the prevention of postsurgical adhesion formation in rat models. *J Obstet Gynaecol* 2000; 20: 78-80.
120. Vrijland WW, Tseng LN, Eikman HJ, Hop WC, Jakimowicz JJ, Leguit P, Stassen LP, Swank DJ, Haverlag R, Bonjer HJ, Jeekel H. Fewer intraperitoneal adhesions with use of hyaluronic acid-carboxymethylcellulose membrana: a randomized clinical trial. *Ann Surg* 2002; 235: 193-199.
121. Guida M, Acunzo G, DiSpiezio Sardo A, Bifulco G, Piccoli R, Pellicano M, Cerrota G, Cirillo D, Nappi C . Effectiveness of auto-crosslinked hyaluronic acid gel in the prevention of intrauterine adhesions after hysteroscopic surgery: a prospective, randomized, controlled study. *Hum Reprod* 2004; 19: 1461–1464.
122. Johns DB, Keyport GM, Hoehler F, DiZerega. Reduction of postsurgical adhesions with Intergel adhesion prevention solution: a multicenter study of safety and efficacy after conservative gynecologic surgery. *Fertil Steril* 2001; 76: 595-604.
123. Lunderff P, Donnez J, Korell M, Audebert AJ, Block K, DiZerega GS. Clinical evaluation of a viscoelastic gel for reduction of adhesions following gynaecological surgery by laparoscopy in Europe. *Hum Reprod* 2005; 20: 514-520.

124. Young P, Johns A, Templeman C, Witz C, Webster B, Ferland R, Diamond MP, Block K, DiZerega G. Reduction of postoperative adhesions after laparoscopic gynecological surgery with Oxiplex/AP Gel: a pilot study. *Fertil Steril* 2005; 84: 1450-1456.
125. Tulandi T, Al-Shahrani A. Adhesion prevention in gynecologic surgery. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005; 17: 395-398.
126. Tingstedt B, Nehez L, Axelsson J, Lindman B, Andersson R. Increasing anastomosis safety and preventing abdominal adhesion formation by the use of polypeptides in the rat. *Int J Colorectal Dis* 2005; 3: 1-7.
127. Bowers D, Raybon RB, Wheelless CR Jr Hyaluronic acid-carboxymethylcellulose film and perianastomotic adhesions in previously irradiated rats. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181: 1335-1337.
128. Rodgers KE, Verco SJ, DiZerega GS. Effects of intraperitoneal 4% icodextrin solution on the healing of bowel anastomoses and laparotomy incisions in rabbits. *Colorectal Dis* 2003; 5: 324-30.
129. Reijnen MM, de Man BM, Hendriks T, Postma VA, Meis JF, van Goor H. Hyaluronic acid-based agents do not affect anastomotic strength in the rat colon, in either the presence or absence of bacterial peritonitis. *Br J Surg* 2000; 87: 1222-1228.
130. Yamaner S, Kalayci M, Barbaros U, Balik E, Bulut T. Does hyaluronic acid-carboxymethylcellulose (HA-CMC) membrane interfere with the healing of intestinal suture lines and abdominal incisions? *Surg Innov* 2005; 12: 37-41.
131. Buckenmaier CC 3rd, Summers MA, Hetz SP. Effect of the antiadhesive treatments, carboxymethylcellulose combined with recombinant tissue

- plasminogen activator and Seprafilm, on bowel anastomosis in the rat. *Am Surg* 2000; 66: 1041-1045.
132. Medina M, Paddock HN, Connolly RJ, Schwaitzberg SD. Novel antiadhesion barrier does not prevent anastomotic healing in a rabbit model. *J Invest Surg* 1995; 8: 179-186.
 133. Hadaegh A, Burns J, Burgess L, Rose R, Rowe E, LaMorte WW, Becker JM. Effects of Hyaluronic Acid/Carboxymethylcellulose Gel on Bowel Anastomoses in the New Zealand White Rabbit. *J Gastrointest Surg* 1997; 1: 569-578.
 134. Holzman S, Connolly RJ, Schwaitzberg SD. Effect of hyaluronic acid solution on healing of bowel anastomoses. *J Invest Surg* 1994; 7: 431-437.
 135. Bulbuler N, Sapmaz E, Akpolat N, Ustundag B, Kirkil C. Effect of a bioresorbable membrane on postoperative adhesions and wound healing. *J Reprod Med* 2003; 48: 547-550.
 136. Beck DE, Cohen Z, Fleshman JW, Kaufman HS, van Goor H, Wolff BG; Adhesion Study Group Steering Committee. A prospective, randomized, multicenter, controlled study of the safety of Seprafilm adhesion barrier in abdominopelvic surgery of the intestine. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1310-1319.
 137. Bristow RE, Montz FJ. Prevention of adhesion formation after radical oophorectomy using a sodium hyaluronate-carboxymethylcellulose (HA-CMC) barrier. *Gynecol Oncol* 2005; 99: 301-308.
 138. Tang CL, Jayne DG, Seow-Choen F, Ng YY, Eu KW, Mustapha N. A Randomized Controlled Trial of 0.5% Ferric Hyaluronate Gel (Intergel) in the

- Prevention of Adhesions Following Abdominal Surgery. *Ann Surg* 2006; 243: 449-455.
139. Menzies D, Hidalgo Pascual M, Walz MK, Duron JJ, Tonelli F, Crowe A, Knight A. Use of icodextrin 4% solution in the prevention of adhesion formation following general surgery: from the multicentre ARIEL Registry. *Ann R Coll Surg Engl* 2006; 88: article in press.
140. Becker JM, Dayton MT, Fazio VW, Beck DE, Stryker SJ, Wexner SD, Wolff BG, Roberts PL, Smith LE, Sweeney SA, Moore M. Prevention of postoperative abdominal adhesions by a sodium hyaluronate-based bioresorbable membrane: a prospective, randomized, double-blind multicenter study. *J Am Coll Surg* 1996; 183: 297-306.
141. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from Mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-156.
142. Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-904.
143. Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416: 545-548.
144. Terada N, Hamakazi T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416: 542-545.
145. Wang X, Montini E, Al-Dhalimy E, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol* 2002; 161: 565- 574.

146. Willebring H, Bailey AS, Foster M, Akkari Y, Dorrell C, Olson S et al. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat Med* 2004; 10: 744-748.
147. Snack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science* 2000; 287: 1431-1433.
148. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden, stem cells and their niches. *Science* 2000; 287: 1427-1430.
149. Streuli C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 634-640.
150. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7: 211-228.
151. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood or Adipose Tissue. *Stem Cells* 2006; 24: 1294-1301.
152. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003; 174: 101-109.
153. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279-4295.
154. Wickham MQ, Erickson GR, Jimble JM, Vail TP, Guilak F. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 2003; 412: 196-212.

155. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrik MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109: 199-209.
156. Di Rocco G, Iachininoto MG, Tritarell A, Straino S, Zacheo A, Germani A, Crea F, Capogrossi MC. Myogenic potential of adipose tissue derived cells. *J Cell Science* 2006; 119: 2945-2952.
157. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Commun* 2002; 290: 763-769.
158. Dragoo JL, Choy JY, Lieberman JR, Huang J, Zuk PA, Zhang J, Hedrik MH, Benhaim P. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res* 2003; 21: 622-629.
159. Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, Takase B, Ishizuka T, Kikuchi M, Fujikawa K. Osteogenic potential of human adipose tissue derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* 2004; 178: 2-12.
160. Safford KM, Safford SD, Gimble JM, Shetty AK, Rice HE. Characterization of neuronal glial differentiation of murine adipose derived adult stromal cells. *Exp Neurol* 2004; 187: 319-328.
161. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, Muller B, Zulewski H. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 341: 1135-1140.

162. Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, Kresh JY. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126: 124-132.
163. Planat-Bernard V, Menard C, Andre M, Puceat M, Perez A, Garcia-verdugo JM, Penicaut L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stromal cells. *Circ Res* 2004; 94: 223-229.
164. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretation of angiogenic and apoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109: 1292-1298.
165. Brozka M, Geiger H, Gaver S, Baer P. Epithelial differentiation of human adipose tissue derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 142-150.
166. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 258-264.
167. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2005; 129: 118-29.
168. Plumas J, Chaperot L, Richard MJ, Molens JP, Bensa JC, Favrot MC. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia* 2005; 19: 1597-1604.

169. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 2003; 5: 485-489.
170. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003; 31: 890-896.
171. Cui L, Yiu S, Yang P, Lui B, Zhang Y, Lui W, Cao YI. Human adipose derived stem cells suppress lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 85: 1890-1894.
172. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 2003; 5: 485-489.
173. Fathke C, Wilson L, Hutter J, Kapoor V, Smith A, Hocking A, Isik F. Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem Cells* 2004; 22: 812-22.
174. Badiavas EV, Abedi M, Butmarc J, Falanga V, Quesenberry P. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* 2003; 196: 245-250.
175. Satoh H, Kishi K, Tanaka T, Kubota Y, Nakajima T, Akasaka Y, Ishii T. Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds. *Cell Transplant* 2004; 13: 405-412.
176. Fu X, Fang L, Li X, Biao C, Sheng Z. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. *Wound Rep Reg* 2006; 14: 325-335.
177. Lim JK, Hui J, Li L, Thambyah A, Goh J, Lee EH. Enhancement of tendon graft osteointegration using mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 2004; 20: 899-910.

178. García-Olmo D, Herreros Marcos D, Pascual Migueláñez I, Pascual Martínez M. Perspectivas para el uso clínico de las células madre. JANO 2006; 1605: 29-33.
179. www.clinicaltrials.com
180. Yoon J, Min BG, Kim YH, Shim WJ, Ro YM, Lim DS. Differentiation, engraftment and functional effects of pre-treated mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarct model. Acta Cardiol 2005; 60: 277-284.
181. Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. Circulation 2005; 112: 214-223.
182. Makkar RR, Price MJ, Lill M, Frantzen M, Takizawa K, Kleisli T, Zheng J, Kar S, McClellan R, Miyamota T, Bick-Forrester J, Fishbein MC, Shah PK, Forrester JS, Sharifi B, Chen PS, Qayyum M. Intramyocardial injection of allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells without immunosuppression preserves cardiac function in a porcine model of myocardial infarction. J Cardiovasc Pharmacol Ther 2005; 10: 225-233.
183. Thompson CA, Reddy VK, Srinivasan A, Houser S, Hayase M, Davila A, Pomerantsev E, Vacanti JP, Gold HK. Left ventricular functional recovery with percutaneous, transvascular direct myocardial delivery of bone marrow-derived cells. J Heart Lung Transplant 2005; 24: 1385-1392.
184. Yau TM, Tomita S, Weisel RD, Jia ZQ, Tumati LC, Mickle DA, Li RK. Beneficial effect of autologous cell transplantation on infarcted heart function: comparison between bone marrow stromal cells and heart cells. Ann Thorac Surg 2003; 75: 169-176.

185. Cova L, Ratti A, Volta M, Fogh I, Cardin V, Corbo M, Silani V. Stem cell therapy for neurodegenerative diseases: the issue of transdifferentiation. *Stem cells Dev* 2004; 13: 121-131.
186. Sugaya K. Potencial use of ítem cells in neuroreplacement therapies for neurodegenerative diseases. *Int Rev Cytol* 2003; 228: 1-30.
187. Lazic SE, Barker RA. The future of cell-based transplantation therapies for neurodegenerative disorders. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; 12: 635-642.
188. Snyder BJ, Olanow CW. Stem cell treatment for Parkinson´s disease: an update for 2005. *Curr Opin Neurol* 2005; 18: 376-385.
189. Correia AS, Anisimov SV, Li JY, Brundin P. Stem cell-based therapy for parkinson´s disease. *Ann Med* 2005; 37: 487-498.
190. Burt RK, Oama Y, Traynor A, Kenyon NS. Hematopoietic stem cell therapy for type 1 diabetes: induction of tolerante and islet cell neogenesis. *Autoimmun Rev* 2002; 1: 133-138.
191. Bonner-Weir S. Stem cells in diabetes: what has been achieved. *Horm Res* 2003; 60 Suppl3:10.
192. Nussler A, Konig A, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, Brulport M, Gagelein G, Schormann W, Schulze M, Ellis E, Kraemer M, Nocken F, Fleig W, Mans M. Present status and perspectivas of cell-based therapies for liver diseases. *J Hepatol* 2006; 45: 144-159.
193. Gasbarrini A, Rapaccini GL, Rutilla S, Zocco MA, Tittoto P, Leone G, Pola P, Gasbarrini G, Di Campli C. Rescue therapy by portal infusion of autologous stem cells in a case of drug-induced hepatitis. *Dig Liver Dis* 2006; 26: Article in press.

194. Di Campli C, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Review article: a medicine based on cell transplantation- is there a future for treating liver diseases? *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 473-480.
195. Selden C, Hodgson H. Cellular therapies for liver replacement. *Transpl Immunol* 2004; 12: 273-288.
196. Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg* 2006; 35: 232-242.
197. Dragoo JL, Samami B, Zhu M, Hame SL, Thomas BJ, Lieberman JR, Hedrick MH, Benhaim P. Tissue engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br* 2003; 85: 740-741.
198. Lee JA, Parrett BM, Conejero JA, Laser J, Chen J, Kogon AJ, Nanda D, Grant RT, Breitbart AS. Biological alchemy: engineering bone and fat from fat derived stem cells. *Ann Plast Surg* 2003; 50: 610-617.
199. Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, Hedrick MH, Berthold L, Howaldt HP. Autogenous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniofac Surg* 2004; 32: 370-373.
200. Peterson B, Zhang J, Iglesias R, Kabo M, Hedrick M, Benhaim P, Lieberman JR. Healing of critically sized femoral defects using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng* 2005; 11: 120-129.
201. Zheng B, Cao B, Li G, Huard J. Mouse adipose derived stem cells undergo multilineage differentiation in vitro but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation in vivo. *Tissue Eng* 2006; 12: 1891-1901.

202. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun Res* 2002; 290: 763-769.
203. Nathan S, Das De S, Thambyah A, Fen C, Goh J, Lee EH. Cell based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. *Tissue Eng* 2003; 9: 733-744.
204. Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, Qiao J, Yan Z, Li Z, Tang W, Zheng X, Tian W. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 929-939.
205. Kang SK, Shin MJ, Jung JS, Kim Yc, Kim GH. Autologous adipose tissue derived stromal cells for treatment of spinal cord injury. *Stem Cells Dev* 2006; 15: 583-594.
206. Jack G, Almeida F, Zhang R, Alfonso Z, Zuk P, Rodriguez L. Processed lipoaspirate cells for tissue engineered of the lower urinary tract: implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction. *J Urol* 2005; 174: 2041-2045.
207. Bacou F, el Andaloussi RB, Daussin PA, Micallef JP, Levin JM, Chammas M, Casteilla L, Reyne Y, Nougues J. Transplantation of adipose tissue derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. *Cell Transplant* 2004; 13: 103-111.
208. Zeng K, Peng XB, Sun J, Xu D, Meng FY. Transplantation of purified CD 34+ stem cells from autologous peripheral blood for treatment of systemic lupus erythematosus. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2002; 22: 1052.

209. García-Olmo D, García Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1416-1423.
210. Smith SR, Connolly JC, Crane PW, Gilmore OJ. The effect of surgical drainage materials on colonic healing. *Br J Surg* 1982; 69: 153-155.
211. Tan RHH, Bell RJW, Dowling BA, Dart AJ. Suture materials: composition and applications in veterinary wound repair. *Aust Vet J* 2003; 81: 140-145.
212. García-Olmo D, García-Arranz M, García LG, Cuellar ES, Blanco IF, Prianes LA, Montes JA, Pinto FL, Marcos DH, García-Sancho L. Autologous stem-cell transplantation for treatment of recto-vaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 451-454.
213. Lucas PA, Warejcka DJ, Zhang LM, Newman WH, Young HE. Effect of rat mesenchymal stem cells on development of abdominal adhesions after surgery. *J Surg Res* 1996; 62: 229-232.
214. Di Paolo N, Vanni L, Sacchi G. Autologous implant of peritoneal mesothelium in rabbits and man. *Clin Nephrol* 1990; 34: 179-184.
215. Bertram P, Tietze L, Hoopmann M, Treutner KH, Mittermayer C, Schumpelick V. Intraperitoneal transplantation of isologous mesothelial cells for prevention of adhesions. *Eur J Surg* 1999; 165: 705-709.
216. Herrick SE, Mutsaers SE. Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 621-642.

217. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006; 24: 150-154.
218. Castaneda F, Kinne RK. Omental graft improves functional recovery of transected peripheral nerve. *Muscle Nerve* 2002; 26: 527-532.
219. Agnifili A, Schietroma M, Carloni A, Mattucci S, Caterino G, Lygidakis NJ, Carlei F. The value of omentoplasty in protecting colorectal anastomosis from leakage. A prospective randomized study in 126 patients. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1694-1697.
220. Klepetko W, Marta GM, Wisser W, Melis E, Kocher A, Seebacher G, Aigner C, Mazhar S. Heterotopic tracheal transplantation with omentum wrapping in the abdominal position preserves functional and structural integrity of a human tracheal allograft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 127: 862-867.
221. Puma F, Fedeli C, Ottavi P, Porcaro G, Battista Fonsi G, Pardini A, Daddi G. Laparoscopic omental flap for the treatment of major sternal wound infection after cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126: 1998-2002.
222. Maloney CT Jr, Wages D, Upton J, Lee WP. Free omental tissue transfer for extremity coverage and revascularization. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111: 1899-1904.
223. Matoba Y, Katayama H, Ohami H. Evaluation of omental implantation for perforated gastric ulcer therapy: findings in a rat model. *J Gastroenterol* 1996; 31: 777-784.
224. Hendriks T, Mastboom WJ. Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. *Dis Colon Rectum* 1990; 33: 891-901.

225. Ikeuchi D, Onodera H, Aung T, Kan S, Kawamoto K, Imamura M, Maetani S. Correlation of tensile strength with bursting pressure in the evaluation of intestinal anastomosis. *Dig Surg* 1999; 16: 478-85.
226. Weiber S, Jiborn H, Zederfeldt B. Preoperative irradiation and colonic healing. *Eur J Surg* 1994; 160: 47-51.